

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Influencia de interferentes en el recuento plaquetario
en pacientes hemato-oncológicos mediante el principio
de impedancia y recuento óptico/fluorescente en el
analizador SYSMEX XE-2100 FULL**

TESIS

para optar el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el
área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR:

Roberts Yuri Congona Rivera

ASESORES:

Boris Moisés Valdivia Vizarraga

Paul Avelino Callupe

Lima-Perú

2011

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú Decana de América)

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

**“INFLUENCIA DE INTERFERENTES EN EL RECUENTO PLAQUETARIO EN
PACIENTES HEMATO-ONCOLÓGICOS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE
IMPEDANCIA Y RECUENTO ÓPTICO/FLUORESCENTE EN EL ANALIZADOR
SYSMEX XE 2100 FULL”**

AUTOR:

Bach. Roberts Yuri Congona Rivera

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

LIMA-PERÚ

2011

**“INFLUENCIA DE INTERFERENTES EN EL RECuento PLAQUETARIO EN
PACIENTES HEMATO-ONCOLOGICOS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE
IMPEDANCIA Y RECuento OPTICO/FLUORESCENTE EN EL ANALIZADOR
SYSMEX XE 2100 FULL”**

AUTOR:

Bach. Roberts Yuri Congona Rivera

ASESOR:

Lic. Boris Moisés Valdivia Vizarraga

CO-ASESOR:

Lic. Paul Avelino Callupe

AGRADECIMIENTOS:

Al Lic.TM Boris Valdivia Vizarraga por su apoyo durante la realización de la investigación.

Al Lic.TM Paul Avelino Callupe, por ser coasesor de esta investigación, por su preocupación, y constante apoyo.

A los licenciados TM Henry Paz Quiquia, TM Lucila Villanueva P., TM Carlos Llanos, TM Jesús Gutierrez G. y TM Armando Zevallos por su apoyo incondicional en el recuento de plaquetas de los frotices de sangre periférica.

A la Dra.Vilma Herrera por haber facilitado la ejecución de esta investigación en el laboratorio de Hematología general del INEN

A la Bach. Roció Rojas por haberme apoyado con los datos de los pacientes normales.

INDICE

	Pág.
I. RESUMEN.....	7
II. MÉTODOS.....	30
III. RESULTADOS.....	38
IV. DISCUSION.....	58
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES.....	68
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	70
VIII. ANEXOS.....	76

RESUMEN

RESUMEN

El estudio fue realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas en el periodo de enero a mayo del año 2011, en el laboratorio de Hematología General. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de interferentes en el recuento de plaquetas obtenidos por el analizador hematológico Sysmex XE 2100, el cual presenta dos metodologías para el recuento de plaquetas: el método de impedancia hidrofocalizada (**PLT-I**) y el método de citometría de fluorescencia (**PLT-O**), en muestras de pacientes hemato-oncológicos.

El estudio se llevó a cabo mediante una data de información de 232 muestras de personas sanas y 1304 muestras patológicas, se formaron subgrupos de muestras patológicas que tengan un interferente en particular, y realizar el análisis en cada uno de estos sub grupos.

Los interferentes en estudio son los fragmentos de hematíes, microcitos (volumen corpuscular medio <82 fL), agregados plaquetarios, parámetros plaquetarios elevados: PLC-R $> 30\%$ (porcentaje de plaquetas grandes), VPM >11 fL (volumen plaquetario medio), PDW $> 14\%$ (amplitud de distribución plaquetaria)

Se utilizó la impedancia hidrofocalizada del SYSMEX 2100 XE para ser comparada con el método de citometría de fluorescencia. En consecuencia, se determinó, la media aritmética , la desviación estándar y el coeficiente de variación del error absoluto de los recuentos plaquetarios (diferencia **PLT-O – PLT-I**), tanto para los grupos normales y patológicos, en diferentes intervalos de plaquetas e interferentes en particular. El análisis de datos consistió en determinar el r de Pearson, para determinar la fuerza de asociación en los diversos grupos establecidos; el análisis de regresión lineal, con la finalidad de

estudiar el comportamiento del R^2 y la pendiente en las diferentes situaciones propuestas (interferentes). Para el caso de interferentes que no fue posible su cuantificación se hizo uso del estadístico chi cuadrado χ^2 . Finalmente, se realizó el análisis gráfico de concordancia mediante la prueba de Bland – Altman.

Los resultados muestran que en el intervalo de $150-450 \times 10^9$ plaquetas/L hay mayor dispersión alrededor de la media en muestras con interferentes que en muestras que no lo presentan (muestras normales).

La correlación entre los métodos **PLT-O** y **PLT-I** en muestras trombocitopénicas (intervalo de plaquetas: $70 - 150 \times 10^9/L$) disminuye en presencia de interferentes. Los interferentes que produjeron disminución en la correlación fueron P-LCR $>30\%$ y VPM $>11fL$ ($R^2=0.854$). Cuando éstos estuvieron presentes en simultáneo en la muestra, la correlación disminuyó levemente ($R^2=0.849$). Sin embargo, se observó que los fragmentos de hematíes (FRC%) $>10\%$ son los que producen mayor disminución en la correlación ($R^2=0.814$).

Los resultados del test de concordancia entre los métodos evaluados se vio afectada por los interferentes evaluados, siendo los fragmentos de hematíes y agregados plaquetarios los que produjeron mayor discordancia.

Se llegó a la conclusión que los recuentos obtenidos por el método de citometría de fluorescencia en muestras trombocitopénicas y provenientes de pacientes con alguna entidad hemato - oncológica están influenciados por los interferentes evaluados.

Por ello se recomienda utilizar el Sysmex 2100 XE en modo impedancia (con uso del enfoque hidrodinámico) para muestras trombocitopénicas de pacientes con entidades hemato oncológicas debido al riesgo de una alta sobrestimación en el recuento de plaquetas mediante el método óptico y tomar en cuenta las alarmas que emite el equipo

(agregados plaquetarios, fragmentos, distribución anormal plaquetaria, macroplaquetas)
con respecto al recuento de plaquetas.

INTRODUCCION

Las plaquetas fueron descritas por primera vez, como visibles corpúsculos. Su rol en la coagulación y trombosis fue reconocido por el patólogo italiano Giulio Bizzozero (1). Actualmente se conoce que las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos anucleados que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos de la medula ósea (2); el recuento de plaquetas en personas saludables en todas las edades es de $150-450 \times 10^3/\mu\text{L}$; el volumen plaquetario medio, es de 7.7 a 11.2 fL; y la vida útil de la plaqueta es 10 días. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie (3).

Históricamente, las técnicas para el recuento de plaquetas se dividen en los siguientes grupos (4):

- Métodos manuales directos, con hemocitometro y microscopia
- Métodos manuales indirectos, en el cual la cantidad de plaquetas es determinando mediante el recuento directo de hematíes determinado en un frotis de sangre periférica.
- Métodos automatizados

En 1953, Brecher y col. desarrollaron un método manual con microscopia de contraste de fase, que permitió la fácil discriminación de plaquetas de hematíes lisados en un hemocitometro. Aunque el desarrollo del principio Coulter en 1950 revolucionó el recuento en sangre, el recuento de plaquetas fue adicionado solo en los analizadores hematológicos totalmente automatizados a finales de 1970.

El recuento de plaquetas mediante microscopia de contraste de fase es utilizado aún como el método de referencia internacional. Sin embargo, este método no es solo subjetivo, consume tiempo, es tedioso, y resulta en altos niveles de imprecisión con un coeficiente de variación interobservador en el rango de 10 a 25%.

En trombocitopenias muy pocas células son contadas, se observa que el coeficiente de variación se incrementa proporcionalmente. Aunque relativamente impreciso, el método manual todavía ofrece un medio relativamente barato, simple, y viable para enumerar plaquetas en laboratorios no especializados.

La introducción de contadores hematológicos automatizados usando la tecnología de impedancia resultó en una mejora de la precisión, con un coeficiente de variación de menor al 3%, debido a que se hace un recuento más alto de plaquetas. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, el recuento por impedancia todavía tiene limitaciones significativas. Uno de los mayores problemas es que el análisis de medición celular no puede discriminar plaquetas de otras partículas de similar tamaño, como pequeños fragmentos de hematíes, complejos inmunes, y otros. Esto quizá sea erróneamente incluido en el recuento de plaquetas, y en muestras con severas trombocitopenias, el número de partículas interferentes quizá podría exceder el número de verdaderas plaquetas. Las macroplaquetas quizá sean excluidas del recuento debido a su tamaño, porque ellas no pueden ser diferenciadas del tamaño de los hematíes.

1. METODOS DE REFERENCIA PARA EL RECuento DE PLAQUETAS

1.1. Anterior método de referencia, recuento de plaquetas en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fase:

En 1988 este método llegó a ser el método de referencia internacional, por el cual fue utilizado para la calibración de analizadores hematológicos, método de Brecker y Conkrite (5). Consiste en el uso de sangre completa anticoagulada con EDTA. La sangre es diluida en oxalato de amonio 1% (6), los hematíes son lisados pero las plaquetas y los glóbulos blancos permanecen intactos. El recuento es realizado en un hemocitómetro haciendo uso de un microscopio de contraste de fase. Debido a la subjetividad y número de células contadas, limita la exactitud del método (7). El grado de imprecisión es reportado mediante el coeficiente de variación interobservador de un rango de 10 a 25%.(21)

1.2. Actual método de referencia: Razón hematíes / plaquetas (Red Blood Cell /platelet Ratio)

La ICSH (International Council for Standardization in Hematology) recomienda un recuento indirecto de plaquetas mediante citometría de flujo y anticuerpos CD41 y CD61 . El recuento, mediante citometría de flujo, de hematíes y plaquetas específicamente marcadas, junto con un exacto recuento de hematíes determinado con un contador de partículas de apertura por impedancia, mono canal y semiautomatizado. Ello da un

método suficientemente exacto y preciso para ser usado como calibrador de contadores celulares y asignar valores para calibración de materiales (8).

2. METODOS PARA EL RECuento DE PLAQUETAS

2.1. Métodos manuales

2.1.1. Métodos directos

- Método de Brecker y Conkrite
- Método de Rees – Ecker
- Método de Guy y Leakes

2.1.2. Métodos indirectos

La revisión del frotís de sangre periférica nos brinda una estimación cualitativa (normal, bajo o alto) útil del recuento de plaquetas. Además, nos da información de anormalidades en la morfología de estos elementos como las macroplaquetas presentes en algunas neoplasias mieloproliferativas crónicas y macrotrombocitopenia, plaquetas agranulares en el síndrome de plaquetas grises. Además permite evaluar la agregación plaquetaria producida por EDTA, asociada a un falso recuento disminuido de plaquetas; satelitismo plaquetario (plaquetas adheridas alrededor del neutrófilo) pueden conducir a inexactitudes del recuento; y agregados plaquetarios. Por lo tanto, aunque es menos exacto que un método automatizado, tiene mucha utilidad en identificar alteraciones (9).

- Método de Fonio
- Método de Dameshek-modificación de Fonio
- Método de Factor 20 000

2.2. Métodos semi automatizados

Se hace uso del plasma rico en plaquetas obtenido a través de centrifugación de sangre completa con EDTA, y el recuento se realiza utilizando un equipo electrónico de impedancia equipado con un orificio de 70 μm . Por ejemplo el equipo Coulter Thrombocounter C.

2.3. Métodos automatizados

Tanto el método óptico como la impedancia han permitido investigar diversos interferentes en el recuento plaquetario, como es el caso de la agregación plaquetaria (10)

Posteriormente, en la década de los noventa, los marcadores inmunológicos fueron utilizados, los cuales reconocían antígenos específicos de la superficie de las plaquetas que permitieron la identificación de plaquetas por citometría de flujo. Más tarde esto permitió el desarrollo de un método de referencia para el recuento de plaquetas usando CD41 y CD61 basado en la razón entre hematíes/plaquetas.

2.3.1. Método basado en Impedancia

El principio de la impedancia o “Principio Coulter”, fue descrito por Wallace Coulter. Esta técnica de sistema de flujo ha sido desarrollada para detectar la alta frecuencia de cambios de resistencia y capacitancia en un orificio sensor debido al paso de células a través del orificio (11).

En este método, las células son consideradas como partículas completamente resistivas y no conductoras. Cuando las células están suspendidas en una solución electrolítica y pasan a través de una apertura, el cambio en la impedancia eléctrica es detectado en esa zona. Cada célula da una señal de impedancia, el cual es proporcional al volumen de las células detectadas, y así, este método puede ser usado para obtener tanto el tamaño como el número de células. Al inicio este método solo fue aplicado para el recuento de hematíes y leucocitos, mas tarde se aplicó para el recuento de plaquetas, pero se hacía uso de plasma rico en plaquetas. Posteriormente, se mejoró esta tecnología mediante el enfoque hidrodinámico y para la corrección de doble coincidencia, lo que condujo a la discriminación de hematíes y plaquetas, obteniendo un recuento más exacto de plaquetas en sangre periférica.

El software del analizador tiene integrado una fórmula para que la coincidencia sea corregida. Sin embargo, la corrección del recuento no determina si el pulso grande se debe al paso de dos células pequeñas o una célula, ya que no es el camino para corregir el volumen celular. Los pulsos obtenidos permiten representarlos en una distribución normal y visualizarlos como histogramas en el analizador hematológico.

En este método, las partículas menores a 20 fL, los cuales incluye fragmentos de glóbulos rojos, fragmentos de células leucémicas, microcitos y crioglobulinas pueden ser contadas como plaquetas, resultando en un recuento espúreo elevado.

2.3.2. Métodos de recuento óptico

2.3.2.1. Recuento óptico unidimensional y bidimensional

En el análisis de plaquetas unidimensional, las plaquetas son contadas y medidas por un sistema de citometría de flujo en el cual las células en un diluyente adecuado pasa a través de un estrecho haz de luz (laser de helio-neón).

La iluminación y la dispersión de luz por cada célula es medida en un ángulo. Esto conduce a la evaluación del número de pulsos eléctricos generados en proporción al número y volumen de células. Para mejorar la discriminación de la exactitud de plaquetas y otras partículas diferentes a esta, se introdujo la dispersión de luz laser en dos dimensiones. La medida de las dos dispersiones de luz son convertidas en información de volumen (medida del tamaño) e índice de refractividad (densidad de la plaqueta) obtenidas mediante el uso de la teoría Mie (12) de la dispersión de luz de esferas homogéneas.

El análisis integrado es usado para distinguir plaquetas, macroplaquetas, hematíes, fragmentos de células y desechos. Las plaquetas son identificadas en un citograma de dispersión (dispersograma) basado en volumen e índice de refractividad. Los fragmentos de hematíes y microcitos con el mismo rango de volumen tienen mayor índice de refractividad que las plaquetas. Las células rojas fantasmas (debris) tienen menor índice de refractividad que las plaquetas.

La introducción del recuento óptico de plaquetas ha mejorado la exactitud en muestras con macroplaquetas (13).

2.3.2.2. Recuento óptico de plaquetas fluorescentes – citometria de fluorescencia (Optical light scatter/fluorescence)

El recuento de plaquetas ópticas fluorescentes utiliza una tinción de polimetina para teñir los ácidos nucleicos de células reticuladas, membrana de plaquetas y gránulos. Esta tecnología lleva un conteo simultáneo de reticulocitos, hematíes y plaquetas fluorescentes. En la celda de flujo, cada célula pasa a través de un rayo de luz de un láser semiconductor. La intensidad de la fluorescencia de cada célula es analizada, lo cual conduce la separación de plaquetas de eritrocitos y reticulocitos. La tinción fluorescente de las plaquetas no solo lleva a la exclusión de partículas no plaquetarias, sino también conduce la inclusión de plaquetas gigantes.

2.3.3. Método de recuento inmunológico de plaquetas

El principio de esta metodología involucra sangre anticoagulada con EDTA con anticuerpos monoclonales antiplaquetarios, los cuales esta conjugado con una sustancia fluorescente, por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína (FITC).

El primer requerimiento para este método es una inequívoca discriminación de las plaquetas, de partículas no plaquetarias y de otras células. El anticuerpo debe ser capaz de reconocer todas las plaquetas. La coincidencia (plaquetas: hematíes y hematíes: hematíes) debe ser eliminada por selección de dilución óptima, 1000 eventos de plaquetas son contadas para asegurar la exactitud incluso en muestras trombocitopénicas. A partir de ello, el recuento de plaquetas se deriva mediante la razón de plaquetas fluorescentes y hematíes, en la muestra. La principal ventaja de la razón de hematíes es que, si la muestra que se provee se mezcla bien, y los eventos de coincidencia (hematíes-plaquetas; hematíes-hematíes) son eliminados por dilución óptima, el recuento obtenido no solo es exacto y preciso, pero también independiente de potencial pipeteo de artefactos. El recuento de plaquetas inmunológico es simple, rápido, seguro y fácilmente transferible a algún laboratorio con un citómetro de flujo. Hay buena correlación con el existente método manual recomendado para el recuento normal de plaquetas.

3. ANALIZADORES HEMATOLOGICOS PARA EL RECuento DE PLAQUETAS

Principios y coeficientes de variación (CV) de los analizadores hematológicos por Hong H.K, Kim M.J.(14) Coeficiente de determinación (R^2) de análisis del regresión lineal de

cada principio contra el método de referencia internacional en recuentos $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$ por Sandhaus L.M. (15)

3.1. Cell Dyn Sapphire

Este analizador hematológico se caracteriza por realizar el recuento de plaquetas mediante tres metodologías: modo óptico (optical dual angle light scatter), modo impedancia, y método de inmunoplaquetas:

Recuento plaquetario:	CV:
• $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$	3.3
• $50-150 \times 10^3/\mu\text{L}$	5.3
• $150-450 \times 10^3/\mu\text{L}$	2.2
• $>450 \times 10^3/\mu\text{L}$	5.3

El Cell-Dyn 4000 (Abbot Diagnostics) utiliza el anti CD-61 para el método de inmunoplaquetas y es el que tiene mejor correlación con el actual método de referencia, sin embargo solo es utilizado para corroborar recuento bajos en severas trombocitopenias debido a que utiliza recursos extras en lo referido al anti CD 61(16).

3.2. Pentra 120 Retic

La metodología utilizada es la impedancia, datos de CV y R^2 no estan reportados en la bibliografía consultada.

3.3. Beckman Coulter LH 750

Al igual que el Pentra el Beckman Coulter hace uso de la impedancia para realizar los recuentos de plaquetas.

Recuento plaquetario:	CV:	R^2
• $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$	6.0.....	0.88
• $50-150 \times 10^3/\mu\text{L}$	5.5	
• $150-450 \times 10^3/\mu\text{L}$	2.5	
• $>450 \times 10^3/\mu\text{L}$	2.2	

EL LH750 y el GEN S consideran a las partículas entre 2 y 20 fL como plaquetas (17)

3.4. Bayer Advia 120

Este analizador se caracteriza por utilizar el modo óptico en doble ángulo (“optical dual angle light scatter”).

Recuento plaquetario:	CV:	R ² :
• <50 x10 ³ /μL.....	7.8.....	0.81
• 50-150 x10 ³ /μL.....	3.3	
• 150-450 x10 ³ /μL.....	2.1	
• >450 x10 ³ /μL.....	2.4	

El Bayer H3 utiliza el modo óptico de un solo ángulo (“Optical Single Angle Light Scatter”)

3.4.1. Parámetros relacionados a plaquetas

Masa plaquetaria media (MPM) y componente plaquetario medio (CPM)

El MPM es calculado a partir del MPV y el MPC y se expresa en pg. El MPC son las siglas de componente plaquetario medio, que es la concentración de plaquetas expresada en g/L, cuando esta reducido indica activación plaquetaria el cual ha sido descrita en la patogénesis de un amplio rango de enfermedades. Este parámetro se ve afectado por el anticoagulante, ya que produce activación plaquetaria.

3.5. Sysmex 2100 XE

El analizador hematológico Sysmex XE 2100 hace uso tanto del principio de citometría de fluorescencia (modo óptico) y el modo impedancia para el recuento de plaquetas.

Modo óptico (recuento óptico fluorescente):

Recuento plaquetario:	CV:	R ² :
• <50 x10 ³ /μL.....	4.5.....	0.72
• 50-150 x10 ³ /μL.....	4.4	
• 150-450 x10 ³ /μL.....	3.0	
• >450 x10 ³ /μL.....	2.0	

Modo impedancia

Recuento plaquetario:	CV:	R ² :
• <50 x10 ³ /μL.....	5.6.....	0.92
• 50-150 x10 ³ /μL.....	2.8	
• 150-450 x10 ³ /μL.....	1.9	
• >450 x10 ³ /μL.....	2.6	

El modo de impedancia del Sysmex es la segunda metodología que guarda mejor correlación con el actual método de referencia internacional.

El recuento de plaquetas por impedancia se realiza mediante 3 discriminadores: bajo (entre 2-6 fL), alto (entre 12-30 fL) y uno fijo (12fL). Estos discriminadores permiten obtener diversos parámetros plaquetarios.

En el recuento óptico de plaquetas fluorescentes, la sangre es diluida y teñida. Como las partículas de células sanguíneas pasan en una línea a través del centro de la celda de flujo, se previene la generación de pulsos sanguíneos anormales y se reduce la contaminación de la celda de flujo. Un rayo producido por un láser semiconductor es emitido hacia las células sanguíneas que pasan a través de la celda de flujo. La luz dispersada frontal es recibida por el fotodiodo, y la luz dispersada lateral y luz fluorescente lateral son recibidas por el tubo fotomultiplicador. Esta luz es convertida a pulsos eléctricos, haciendo posible obtener información sobre las células sanguíneas.

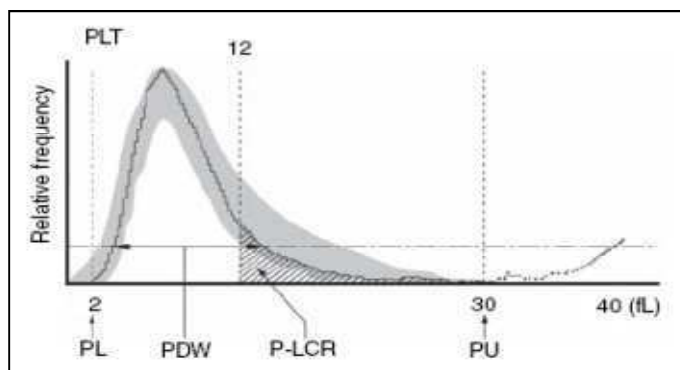
Cuando se emite luz hacia un material fluorescente, tal como células de la sangre teñidas, se produce una luz de longitud de onda más larga que la luz original. La intensidad de la luz fluorescente aumenta cuando la concentración de la tinción se vuelve mayor. Midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida, es posible obtener información sobre el grado de tinción de las células sanguíneas. La luz fluorescente es emitida en todas direcciones; el XE-2100 detecta la luz fluorescente que es emitida lateralmente.

El algoritmo de conmutación, es un software utilizado por el SYSMEX 2100 XE y es utilizado para reportar “el mejor recuento de plaquetas”, principio óptico o impedancia.

En muestras con microcitos o fragmentos de hematíes o plaquetas gigantes la curva de distribución plaquetaria es afectada y el recuento óptico deberá ser reportado.

En presencia de fragmentos de leucocitos, los cuales son incluidos en el recuento óptico de plaquetas, se genere una dispersión anormal de plaquetas y el algoritmo ocasiona que la impedancia sea reportada.

3.5.1. Parámetros relacionados a plaquetas



BRIGGS y col. "Continuing developments with the automated platelet count" (18)

3.5.1.1. Porcentaje de plaquetas grandes (P-LCR: "Platelet Large Cell Ratio")

Este parámetro cuantifica el porcentaje de plaquetas grandes mayores a 12 fL, y dividido por el número total de plaquetas. La media del P-LCR fue de 30.1% en 309 muestras con un rango de referencia están entre 18.5-42.3% para varones y 17.5-42.3% para mujeres (19)

3.5.1.2. Volumen plaquetario medio (VPM)

Es el volumen promedio de una plaqueta. El calcula de este parámetro se calcula así:

$$\text{VPM (fL)} = \text{PCT (\%)} / \text{PLT (x10}^3/\mu\text{L)} \times 1000$$

Los valores de referencia de este parámetro está entre 7.7 a 11.2 fL. Este parámetro se ve afectado por el tiempo que tiene la muestra en contacto con el EDTA, se incrementa en un 7.9% en 30 minutos y 13.4% a las 24 horas. Los incrementos ocurren en las primeras 6 horas (20). El VPM se encuentra normal en la trombocitopenia autoinmune e incrementado en la coagulación intravascular diseminada y microangiopatía..El VPM es

más bajo en analizadores basados en la medición de la dispersión de luz que, en los de impedancia (21).

3.5.1.3. Plaquetocrito (PCT)

Plaquetocrito, se llama al hematocrito de plaquetas o porcentaje de volumen de plaquetas, y su peso está hacia la frecuencia de plaquetas.

3.5.1.4. Ancho de distribución de plaquetas (PDW, Platelet Distribution Wide)

Asumiendo que la altura máxima de la curva es 100%, el ancho de la distribución al nivel de altura del 20% es el PDW. Las distribuciones del tamaño de la partícula de las plaquetas son analizadas usando tres discriminadores (22):

- discriminador más bajo (LD): entre 2 - 6 fL
- discriminador más alto (UD): entre 12 - 30 fL
- discriminador fijo: a 12 fL.

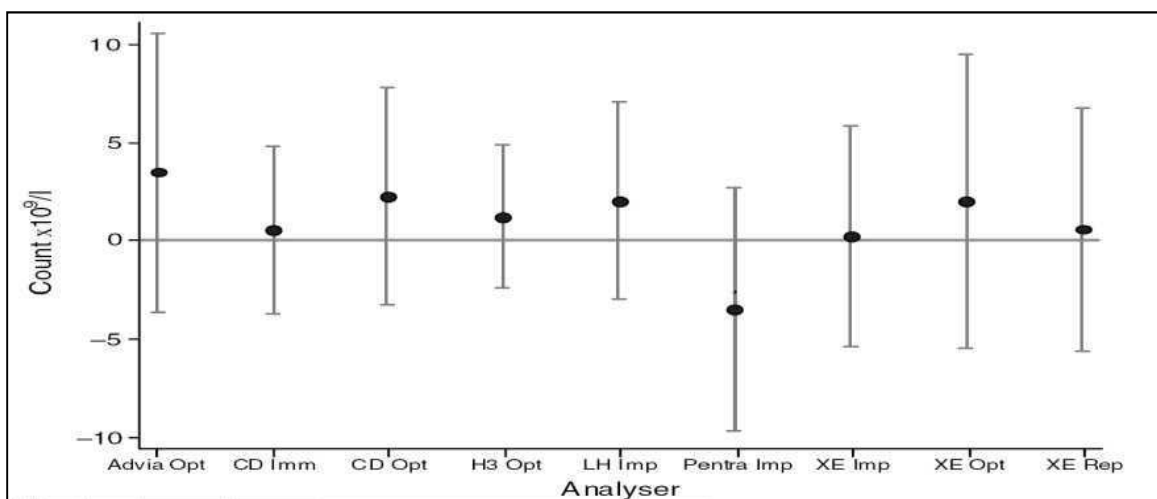
La media de PDW fue de 13.3% en 231 muestras, con un rango de referencia de 10.0%-17,9% para el 5^{to} -95th percentil, con un intervalo de confianza de 95% (23). Valores de referencia 10.1-16.1% para varones y 9.9-15.4% evaluado con el Sysmex XE-5000.

3.5.1.5. Plaquetas reticuladas

Son plaquetas ricas en ARN y son reflejo de la capacidad de la médula ósea para producir plaquetas. El colorante fluorescente polimetina es usado para teñir ácido nucleico de la plaqueta reticulada, membrana plaquetaria y gránulos plaquetarios. Es utilizada para predecir la recuperación de plaquetas seguida de la mielosupresión por quimioterapia, así como diferenciar la purpura trombocitopénica idiopática de una anemia aplásica (24).

4. INTERFERENTES QUE PUEDEN AFECTAR EL RECuento DE PLAQUETAS

La precisión en el recuento de plaquetas en casos de trombocitopenia severa esta disminuida, con un incremento de variabilidad del recuento debido a la falla de la metodología para discriminar plaquetas de otros fragmentos celulares y partículas de similar tamaño. Esto puede resultar en un espúreo recuento de plaquetas ,que puede ser incrementado o disminuido.



Comparación de recuento de plaquetas por varios analizadores (Opt: óptico ; Imm: inmunoplaquetas; Imp: impedancia) con el método de referencia internacional en recuento mediante el Bland - Altman Plot. "Accuracy of platelet counting Haematology analyzers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion"¹⁶

Los analizadores Sysmex, Cell-Dyn y Advia tienden a sobrestimar el recuento de plaquetas con la excepción del Pentra, el cual subestima el recuento en una media de 3-4 x 10⁹plaquetas/L

4.1. Macroplaquetas

En situaciones patológicas o no, algunas plaquetas demuestran un alto volumen, por esta razón los analizadores consideran partículas hasta de 30 ó 36 fL de volumen. Existe la posibilidad que las plaquetas gigantes no sean discriminadas de microcitosis, por

lo cual son excluidas del recuento y resulta en un falso recuento disminuido de plaquetas (25). La presencia de estas macroplaquetas es frecuente en pacientes con mielodisplasia, enfermedades mieloproliferativas crónicas y trombocitopenia autoinmune el cual afecta aquellos analizadores que usan el principio de la impedancia.

4.2. Fragmentos de leucocitos

Los pacientes bajo terapia citotóxica pueden presentar, en sus muestras, fragmentos de leucocitos seguidos de las apoptosis los cuales se tiñen con el colorante fluorescente y son incluidos en el recuento de citometría de fluorescencia, debido a las características compartidas del interferente con el tamaño y la intensidad de fluorescencia de las plaquetas. Estas partículas provienen de la fase leucémica de un linfoma pobremente diferenciado, durante la quimioterapia. Además, reconocer los fragmentos en un frotis de sangre periférica es difícil pero es más fácil demostrarlo por microscopia electrónica (26)

4.3. Microcitos

Los contadores hematológicos basados en impedancia no pueden discriminar plaquetas de hematíes muy pequeños; y, macroplaquetas de hematíes de tamaño normal (27). El actual método de referencia también hace uso de la impedancia para realizar el recuento de hematíes con la finalidad de obtener un ratio con las plaquetas, sin embargo, si la muestra tiene microcitos (por ejemplo, en una anemia por deficiencia de hierro, microesferocitos en quemaduras agudas) esto debería ser analizado con precaución porque probablemente sea inexacto, y en consecuencia producir una sobrestimación de plaquetas.

4.4. Satelitismo plaquetario

Al fenómeno en que las plaquetas presentan adheridas alrededor de leucocitos se denomina satelitismo plaquetario (28), el cual genera falsos recuentos disminuidos. En casos extremos los neutrófilos se presentan agregados quizá por plaquetas adherentes.

Además se ha comprobado que en el almacenamiento de la sangre completa el recuento de plaquetas tiende a aumentar a partir de las 8 horas, la hipótesis que se maneja es que cuando la muestra es fresca las plaquetas tienen una alta expresión de CD62P (un marcador de activación plaquetaria), por lo que son más activas y tienden a formar complejos con leucocitos, por lo que hay una sub estimación en el recuento (29).

4.5 Agregados plaquetarios (platelet clumps)

Los agregados se forman debido al contacto prolongado del anticoagulante EDTA (etilen diamino tetra acético) con las plaquetas, por una mala homogenización de la muestra al ser obtenida o por una mala venopunción. Se asocian frecuentemente a un espúreo recuento sub estimado de plaquetas. La trombocitopenia espúrea por presencia de EDTA está relacionada a la circulación de (auto) anticuerpos dirigidos contra epítopes del complejo glicoproteico IIb/IIIa que se expresan en la membrana de la plaqueta solo en presencia del EDTA (Zandecki y col). Los agregados se comienzan a formar a los pocos minutos del contacto con el EDTA, y se hace más notorio cuando las muestras son guardadas a temperatura ambiente, los analizadores no la identifican como una población definida y la reportan mediante alarmas (flag): PLT clumps, large or giant PLT)

Las plaquetas anormales de enfermedades mieloproliferativas muestran ser mucho más sensibles que plaquetas normales para formar agregados en presencia de EDTA (30)

Los analizadores tienen la capacidad para detectarlos mediante la generación de “flag” o alarmas pero la sensibilidad y especificidad varía.

4.6. Plaquetas agranulares

En el síndrome de plaquetas grises se presentan plaquetas con la característica de ser agranulares el cual es una alteración que afecta al recuento basado en citometría de fluorescencia debido a la disminución en la intensidad fluorescente de las plaquetas.

4.7. Recuento de fondo (“Background”)

En recuentos de plaquetas por debajo de $20 \times 10^9/L$ los analizadores de impedancia quizá lleguen a ser menos exactos debido a los pocos eventos analizados y al incremento de la influencia del recuento de fondo, que por lo general es de $5 \times 10^9/L$ (ejemplo, SYSMEX 1800 XT)

4.8. Bacterias

Estos microorganismos pueden generar aumentos en el recuento plaquetario, ocurre en raras situaciones (cuando el paciente esta es sepsis). El histograma es afectado y produce una agregación hacia la izquierda del mismo, donde se ubican las partículas más pequeñas. No solo es el caso de bacterias, sino también por hongos como el caso de *Candida sp*, o pequeños hematíes afectados por trofozoitos de *Plasmodium falciparum*.

4.9. Crioglobulinas

Las crioglobulinas posiblemente generen un espúreo recuento elevado de plaquetas si estos son lo suficientemente pequeños, y en pocos casos alterar el recuento de hematíes.

4.10. Lípidos

En pacientes con hiperquilomicronemia, en muestras después de las comidas, o después de la terapia de nutrición parenteral, los lípidos quizá formen pequeñas gotitas in vitro, que interfieren el recuento plaquetario, de igual forma los pacientes leucémicos tratados con L-asparaginasa, una droga conocida por inducir anomalías en los lípidos. Los lípidos poseen un alto índice de refractividad y puede generar señales anormales localizadas cerca al de las plaquetas.

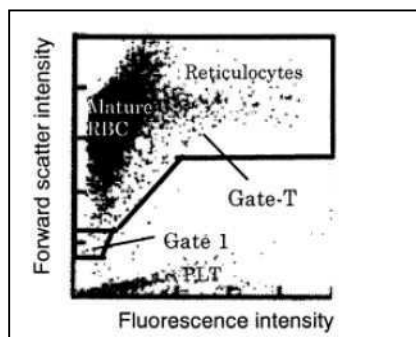
4.11. Fragmentos de hematíes

Los fragmentos son generados producto de la hemólisis de los hematíes, estos tienen un tamaño que varía entre las 2µm y 4µm. Al tener origen en los hematíes estos son fragmentos citoplasmáticos carecen de contenido de ácido nucléico. Su semicuantificación mediante el método manual se realiza en lámina periférica teñida con colorante Wright, y se obtiene al realizar el recuento en mil hematíes. De igual manera éstos se pueden informar de manera cualitativa mediante el uso de cruces.

Se postula que estos fragmentos o esquistocitos generan falsos recuentos (presentes por ejemplo, en la anemia microangiopática) produciendo una sobreestimación del número real de plaquetas en los contadores celulares basados en impedancia.

La influencia como interferente de los fragmentos de hematíes surge cuando su frecuencia es alta y caen en el histograma de plaquetas, siendo contandas falsamente como tal. El porcentaje de fluorescencia y tamaño sigue el siguiente patrón: Hematíes > fragmentos de hematíes > plaquetas. Esto permite discriminar mejor las plaquetas.

Los fragmentos es un nuevo parámetro que se puede cuantificar en el dispersograma del canal RET (en el que cada punto o “dot” en la grafica representa una partícula) en la zona denominada GATE 1 (FRC%) del equipo SYSMEX 2100 XE (31)



El canal RET se muestra como un dispersograma en la zona denominada GATE 1 (FRC%) allí se localizan los fragmentos de hematíes lo cual es cuantificado y expresado tanto en porcentaje (FRC%) como en valor absoluto (FRC#) (32).

Sin embargo en determinadas enfermedades que cursan con microcitosis como es el caso de la anemia asiderocítica los microcitosis caen en GATE 1 lo cual genera un problema en el recuento óptico.

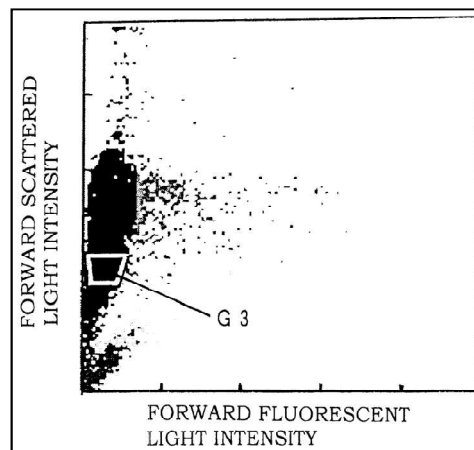
Para resolver ello se obtiene el GATE 3 (zona de microeritrocitos) con la finalidad de corregir el FRC%. La corrección dependerá de la relación del número de dots o puntos que caen en el GATE 3 y el GATE-T (C/A) y el valor predeterminado α (33).

- GATE-T= A; GATE 1= B; GATE 3= C
- α está entre 1-3%
- Sí $C/A < \alpha$, la fórmula aplicada será:

$$F = f(B/A)C/A$$

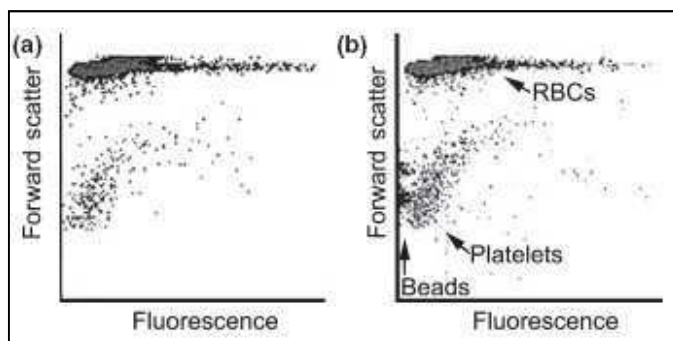
- Sí $C/A > \alpha$, la fórmula será corregida, y se aplicará:

$$f = (B/A) \cdot \exp\{-a(C/A)\}$$



5.12. Partículas de látex

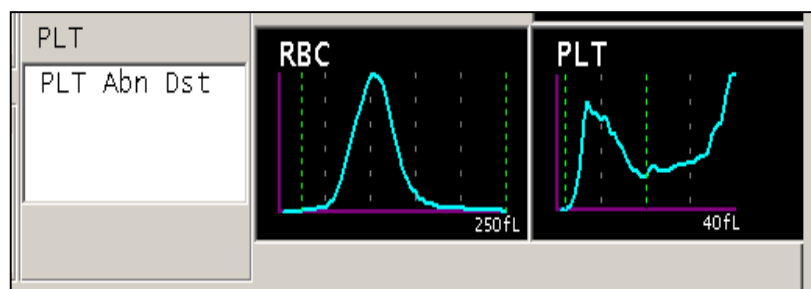
Las partículas de látex no fluorescentes del tamaño de 1 μm afectan el recuento en modo óptico del analizador SYSMEX XE-2100, lo cual produce una sobrestimación en el recuento de plaquetas. Estas no son partículas fisiológicas pero ofrecen la posibilidad de controlar experimentos con muestras, mediante la adición de una concentración conocida de una sola partícula en las muestras de sangre. La impedancia no es afectada debido a que la superficie es sólida de la partícula de látex, que causa señales de impedancia diferente a la de las plaquetas



(a) Muestra control con un recuento de plaquetas de $20 \times 10^9 /\text{L}$; (b) a la misma muestra se le agrego las partículas de látex y fueron contabilizados como plaquetas (34)

5.12. Distribución anormal plaquetaria

El analizador hematológico SYSMEX XE 2100 en modo impedancia, muestra el recuento de plaquetas sobre la base del análisis del histograma obtenido. Sin embargo, cuando la presencia de interferentes es muy elevada, la curva se altera y por tanto el recuento plaquetas. En este caso se emite la siguiente alarma: PLT abn Dst, la cual se muestra en la siguiente imagen:



Histograma de hematies (izquierda) y plaquetas (derecha) del SYSMEX 2100 XE

OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Determinar la influencia de interferentes en el recuento de plaquetas obtenidos por el analizador hematológico Sysmex XE 2100, en muestras de pacientes hemato-oncológicos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

2. Objetivos específicos

- Estudiar la influencia de los interferentes según metodología de medición.
- Establecer correlación entre metodologías con la presencia de cada interferente en estudio.
- Evaluar la influencia de los interferentes en cada uno de los intervalos de recuentos de plaquetas establecido en el estudio

METODO

METODO

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Hematología general del Instituto de Enfermedades Neoplásicas (INEN), durante los meses de enero a mayo del 2011, con las siguientes características:

DISEÑO

Estudio de tipo descriptivo, retrospectivo y transversal.

POBLACION

La población comprende las muestras sanguíneas de pacientes hospitalizados y ambulatorios del INEN, así como donantes del banco de sangre, del mes de enero a mayo del 2011.

MUESTRA

El tipo de muestreo es por conveniencia de tipo incidental, para ello se procedió a trabajar con los resultados de las muestras que llegaron al laboratorio de hematología del INEN procedentes de:

- Donantes del banco de sangre (grupo normal)
- hospitalización y de pacientes ambulatorios (grupo patológico).

El subtotal de muestras de pacientes normales es: **232**

El subtotal de muestras patológicas es: **1305**

La muestra total, corresponde a un **n = 1537**

MARCO MUESTRAL

a. Criterios de inclusión

- ❖ Muestras de pacientes oncológicos hospitalizados del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas .
- ❖ Muestra de sangre venosa obtenidas con anticoagulante EDTA
- ❖ Determinación del recuento plaquetario mediante citometría de fluorescencia e impedancia

b. Criterios de exclusión

- ❖ Ver anexo 2, Procedimiento: Etapa 1 y 3

TIPO DE MUESTREO

Muestreo por conveniencia de tipo incidental

TAMAÑO MUESTRAL

Cantidad de muestras procesadas en los meses Enero-Mayo del 2011

UNIDAD DE ANALISIS

Muestra sanguínea de un paciente del INEN

VARIABLES

➤ Variable I:

Metodología aplicada para el recuento de plaquetas

➤ Variable II:

Interferentes en el recuento plaquetario

TECNICAS Y INSTRUMENTOS

- Analizador Sysmex 2100 XE FULL
- Frotís de sangre periférica
- Ficha de recolección de datos

PLAN DE PROCEDIMIENTOS

Anexo 2

ANALISIS DE DATOS

1. Procesamiento de datos:

Anexo 4

2. Análisis de datos

A. Determinación del error absoluto (e):

La determinación del el error absoluto se estableció mediante la diferencia entre el recuento óptico (PLTO) y el recuento de plaquetas por impedancia (PLTI).

$$e = PLTO - PLTI$$

El recuento plaquetario de PLTI se considera, para este estudio, "valor verdadero". La finalidad es determinar si hay diferencias significativas en muestras con y sin interferentes (patológicas y normales)

i. Determinación de la media aritmética y constantes de precisión en muestras normales:

El error absoluto hallado en los recuentos de plaquetas tanto en muestras normales como patológica, se utilizó para determinar:

- Media aritmética del error absoluto
- Desviación estándar del error absoluto
- Coeficiente de variación

Con la finalidad de hallar diferencias significativas entre el grupo normal y patológico, en el intervalo de plaquetas $150-450 \times 10^9 /L$ (anexo 5)

ii. *Determinación de la media aritmética y constantes de precisión en muestras patológicas, en presencia de interferentes en particular:*

De igual manera que en el punto anterior se determinará, el promedio, DS y CV del error absoluto pero teniendo en cuenta la presencia de un interferente en particular mostrados en el anexo 5.

B. Determinación del coeficiente de relación de Pearson, para un nivel de significancia $p=0,05$

La determinación del r de Pearson se realizó utilizando los valores obtenidos de los recuentos de cada uno de los métodos (impedancia y citometría de fluorescencia) en la misma muestra con la finalidad de saber si la fuerza de asociación entre los métodos se mantiene, en presencia de todos los interferentes evaluados.

i. *Según intervalo de recuento de plaquetas*

Se determinará el r de Pearson en cada uno de los intervalos de plaquetas establecidos (anexo 4B)

ii. *Según intervalo de cantidad de interferente*

Se determinará el r de Pearson en cada uno de los intervalos de interferentes establecidos (anexo 4D)

C. Análisis de regresión lineal

Se procedió a realizar el análisis de regresión lineal con la finalidad de modelizar la relación entre las variables y utilizar una de ellas para explicar la otra. Para ello se tomó como referencia a los recuentos obtenidos por impedancia (X) debido *que en diversos estudios realizados* ^{14,15}, *este método tiene mejor correlación con el actual método de referencia establecido por la ICSH/ISLH “RBC/platelet ratio”* incluso en muestras de pacientes con trombocitopenia severa.

El recuento de plaquetas ópticas será la variable Y. La ecuación de regresión está representada como sigue:

$$Y = a X + b$$

Donde a y b representan a la pendiente de la recta corregida y el intercepto, respectivamente.

- i. Muestras normales: intervalo 150-450 x 10⁹/L
- ii. Muestras patológicas: intervalos 70-150x10⁹/L y 150-450 x 10⁹/L

D. Test del Chi-cuadrado

El estadístico Chi-cuadrado (X²) se utilizó en el caso particular de interferentes de tipo cualitativo (variables excluyentes y dicotómicas), que son reportados por el equipo SYSMEX 2100 XE, los cuales son agregados plaquetarios (platelet clumps), distribución anormal plaquetaria (PLT abn distribution) y fragmentos celulares (fragments).

Ello permitirá saber si estas variables cualitativas están o no asociadas, es decir influyen o no, en el recuento plaquetario obtenido por las metodologías.

El análisis se realizará con muestras tanto normales como patológicas que cumplan con recuentos plaquetarios entre 150 y 450x10⁹/L. Además se estableció una tabla de contingencia de 2x2 por lo tanto los grados de libertad es equivalente a 1, para una seguridad del 95% y α=0.05

	ERROR ABSOLUTO >15x10 ⁹ /L	
INTERFERENTE	Presente	Ausente
Presente	a	b
Ausente	c	d

El estadístico X² para una tabla de 2 x 2 se calcula como sigue:

$$\chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

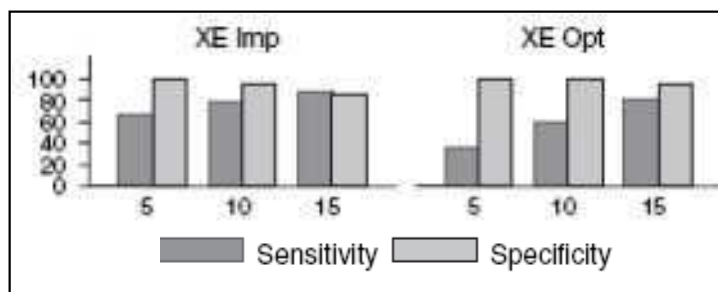
Para eliminar el sesgo de sobrestimación del estadístico X² debido al tamaño muestral en la aplicación del test se utilizó la corrección Yates:

$$\chi_Y^2 = \frac{n \left(|ad - bc| - \frac{n}{2} \right)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Las variables serán los interferentes y el error absoluto (e >15x 10⁹/L)*

*Este valor se obtuvo del promedio de los errores absolutos obtenidos de los recuentos de las dos metodologías automatizadas (PLTO-PLTI) en el grupo de muestras normales, y además es utilizado como umbral de transfusión de plaquetas establecido en el estudio realizado por Segal y col, publicado en el *British Journal of Hematology* del año 2005, para el análisis de especificidad y sensibilidad en umbrales de transfusión de plaquetas, mediante diversos equipos

automatizados –incluido el SYSMEX 2100 XE- comparado con la Metodología de referencia internacional.



Sensibilidad y especificidad del analizador SYSMEX 2100 XE con el Método de referencia internacional¹⁶, para detectar umbrales de transfusión de plaquetas puntos de corte de 5, 10 y 15 x10⁹/L

E. **Test de Bland-Altman (análisis de diferencias individuales)**

Esta prueba determinará la concordancia entre los métodos de medición: recuento de plaquetas mediante impedancia, y citometría de fluorescencia. Este método gráfico está basado en el análisis de las diferencias individuales, que permite determinar los límites de concordancia y visualizar de forma gráfica las discrepancias observadas, con la finalidad de saber hasta qué punto los resultados obtenidos con ambas metodologías son equivalentes.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Filtración de datos

Luego de realizar la filtración de datos por etapas (anexo 2) de un total de 17 590 muestras procesadas en el analizador SYSMEX 2100 XE a partir del 3 de enero al 31 de mayo del 2011, se obtuvo 1305 muestras patológicas con las características requeridas para el estudio. A esta cantidad de muestras obtenidas se suman 232 muestras de pacientes normales los cuales fueron procesadas en el mismo analizador hematológico.

Por tanto, el total de muestras obtenidas es de 1537, de los cuales 232 son normales y 1305 patológicas.

Las muestras normales tienen recuentos entre $150 - 450 \times 10^9/L$, y el número de muestras patológicas se distribuye en los siguientes intervalos, además están separados según el interferente que estas puedan presentar:

N*:interferente cuantitativo presente en la muestra analizada

M*:cantidad subtotal de muestras con un interferente cuantitativo

N *	<70	70-150	151-450	>450	M *
P-LCR>30%	54	51	52	5	162
MPV>11 fL	39	39	39	4	121
PDW>14 %	32	42	52	3	129
MCV<82 fL	40	11	34	16	101
FRC%>10 %	1	45	126	27	199

En algunos subgrupos la cantidad de muestras fue muy pequeña, específicamente en el grupo con trombocitosis (recuento mayor a $450 \times 10^9/L$), debido a que la población estudiada no mostraba más muestras con las características que se requerían, y el diagnóstico de entidades hemato - oncológica. De igual forma sucedió en el intervalo $<70 \times 10^9/L$ en el subgrupo con FRC>10% que solo se obtuvo una muestra con esta característica.

N**:interferentes cuantitativos presentes en la muestra analizada
M**:cantidad subtotal de muestras con dos interferentes cuantitativos

N**	<70	70-150	151-450	>450	M**
MPV>11 fL + P-LCR>30 %	36	42	38	4	120
RDW-CV>14% + MCV<82fL	26	10	25	16	77
PDW>14% + MPV>11fL	22	26	25	3	76

Los interferentes cualitativos, es decir recuentos de plaquetas que cursaron con las alarmas del siguiente cuadro, mostraron la información de que la distribución anormal plaquetario se presentó mayoritariamente en el intervalo $<70 \times 10^9/L$ (por debajo del valor de corte del algoritmo de conmutación mostrado en la imagen del Anexo 11)

N:interferentes cualitativo presentes en la muestra analizada
M:cantidad subtotal de muestras con dos interferentes cuantitativos

N	<70	70-150	151-450	>450	M
Platelet clump	39	26	82	11	158
Fragment?	1	6	44	16	67
Distribución anormal plaquetaria	81	9	4	1	95

Para el posterior análisis estadístico algunos subgrupos no serán sometidos a evaluación por lo reducido de las muestras, o simplemente no hay muestras en el intervalo propuesto -que es el caso del grupo normal que solo tiene muestras en intervalo de 150 – 450 x $10^9/L$ - y se representará con el símbolo ND: No determinado.

2. Determinación de la media y constantes de precisión del error absoluto (exactitud del método de citometría de fluorescencia en comparación al método de impedancia en el intervalo de 150×10^9 - 450×10^9 plaquetas/L):

Muestras normales (intervalo: $150-450 \times 10^9$ /L)

Promedio e	DS e	CV
11.96	13.76	115%

Muestras patológicas (hemato oncológicas, con interferentes; intervalo: $150-450 \times 10^9$ /L)

N*	\bar{X} e	DS e	CV e
P-LCR>30%	10.42	20.87	200%
MPV>11fL	11.68	22.52	193%
PDW>14%	13.56	20.23	149%
MCV<82 fL	16.97	16.71	99%
FRC%>10%	16.51	20.79	126%

N*: interferente cuantitativo presente en la muestra analizada

N**	\bar{X} e	DS e	CV e
MPV>11fL + P-LCR>30%	10.51	23.05	219%
RDW-CV>14 % + MCV<82fL	18.6	16.71	90%
PDW>14% + MPV>11fL	18.28	25.37	139%

N**:interferentes cuantitativos agrupados presentes en la muestra analizada

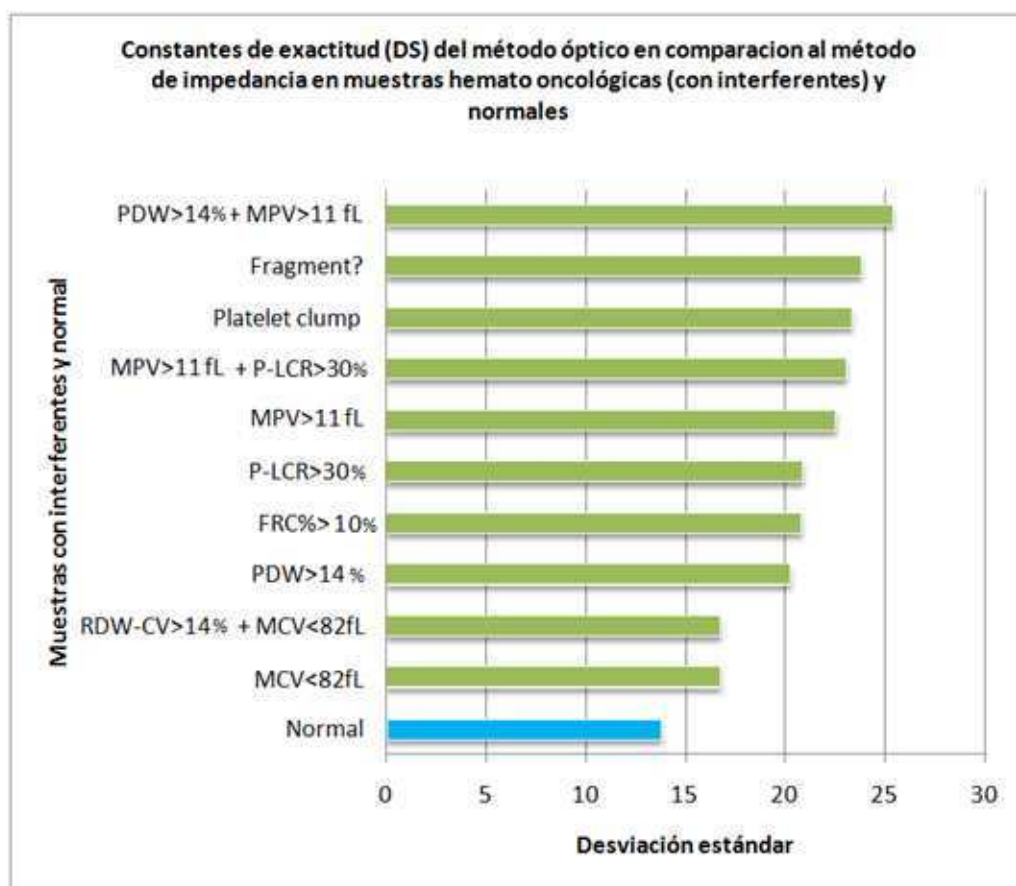
N	\bar{X} e	DS e	CVe
Platelet clump	23.17	23.32	101%
Fragment?	20.45	23.78	116%

N: interferentes cualitativo presentes en la muestra analizada

E: error relativo; e: error absoluto; \bar{X} : promedio; DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

En muestras normales, la desviación estándar (DSe) en el intervalo de $150-450 \times 10^9 /L$ es menor (13.76) que en las muestras con los interferentes evaluados siendo la DS mínima en muestras con $MCV < 82 \text{ fL}$ de 16.71, y DS máxima $PDW > 14\% + MPV > 11 \text{ fL}$ de 25.37. (Ver gráfico n°1)

Gráfico n°1



Similarmente, sucede con el coeficiente de variación (CVe), el cual es menor en muestras normales (115.05%) que en muestras con interferentes, a excepción de interferentes que incluyen $MCV < 82 \text{ fL}$, siendo el máximo en muestras con $MPV > 11 \text{ fL} + P-LCR > 30\%$ con un CV de 219 %.

3. Determinación del coeficiente de relación de Pearson del método de citometría de fluorescencia en comparación al método de impedancia:

Muestras normales

<i>Coeficiente de correlación de Pearson : r</i>				
Intervalos (10 ⁹ /L)	<70	70-150	151-450	>450
Normal	ND	ND	0.969	ND

Muestras patológicas

Interferentes cuantitativos

<i>Coeficiente de correlación de Pearson : r</i>				
<i>Cuantitativo sin agrupar</i>	<70	70-150	151-450	>450
P-LCR>30%	0.977	0.943	0.972	ND
MPV>11fL	0.977	0.925	0.976	ND
PDW>14%	0.981	0.931	0.967	ND
MCV<82 fL	0.989	ND	0.978	ND
FRC%>10%	ND	0.902	0.982	0.959

Interferentes cuantitativos agrupados

<i>Coeficiente de correlación de Pearson : r</i>				
<i>Cuantitativo agrupado</i>	<70	70-150	151-450	>450
MPV>11fL + P-LCR>30%	0.98	0.922	0.972	ND
RDW-CV>14fL + MCV<82fL	0.99	ND	0.976	ND
PDW>14% + MPV>11fL	0.974	0.919	0.98	ND

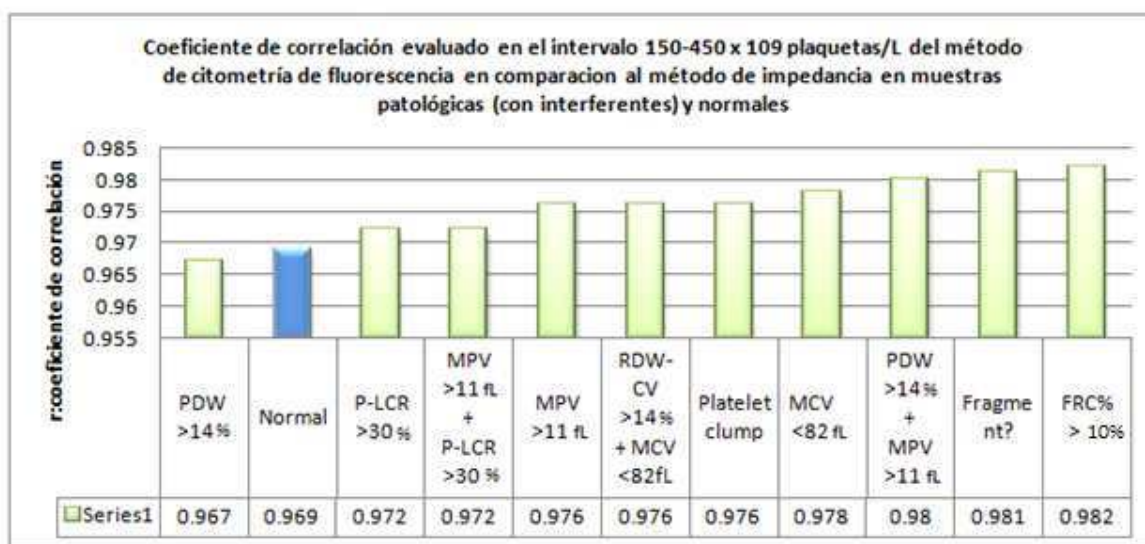
Interferentes cualitativos

<i>Coeficiente de correlación de Pearson : r</i>				
<i>Cualitativo</i>	<70	70-150	151-450	>450
Platelet clump	0.989	0.94	0.976	ND
Fragment?	ND	ND	0.981	0.98
Plt abn distribution	0.98	ND	ND	ND

ND: no determinado ;Plt abn distribution: población anormal plaquetaria

El r de Pearson obtenido en muestras normales, sin interferentes, es de 0.969 lo que indica una buena correlación, sin embargo solo se pudo evaluar en este estudio en el intervalo $150-450 \times 10^9/L$. Los resultados obtenidos con muestras patológicas que presentan interferentes el r fue levemente más alto en todos los casos (interferentes cuantitativos cualitativos, cuantitativos agrupados y sin agrupar). (Ver gráfico n°2).

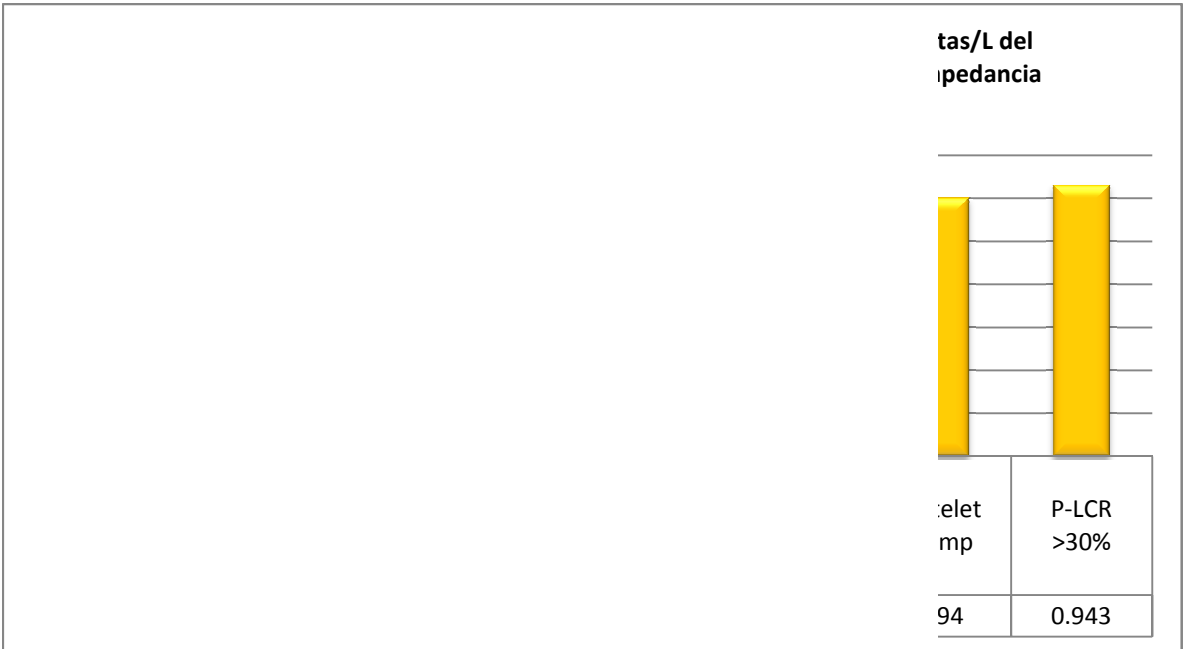
Gráfico n°2



Igualmente, el r de Pearson en el grupo de muestras patológicas con recuentos $<70 \times 10^9/L$ tubo muy buena correlación con r que varían entre 0.97 y 0.98 para todos los casos de interferentes.

Sin embargo, en contraste con los resultados anteriores, en el intervalo de $70-150 \times 10^9/L$ el r disminuyo incluso a 0.902 en presencia del interferente FRC>10% (Ver gráfico n°3).

Gráfico nº3



4. Determinación del coeficiente de relación de Pearson del método de citometría de fluorescencia (PLT-O) en comparación al método de impedancia (PLT-I) en muestras patológicas, según intervalos de cantidad de interferentes

Según intervalo de interferentes independiente del intervalo de recuento de plaquetas

Intervalos por cantidad de interferente	Número de muestras	r independiente del intervalo de plaquetas
PLCR: $\geq 30\%$, $< 40\%$	114	0.997
PLCR: $\geq 40\%$, $< 50\%$	45	0.993
MPV: $\geq 11\text{fL}$, $< 12\text{fL}$	74	0.996
MPV: $\geq 12\text{fL}$, $< 13\text{fL}$	39	0.993
PDW: $\geq 14\%$, $< 16\%$	79	0.995
PDW: $\geq 16\%$, $< 20\%$	43	0.992
MCV: $> 78\text{fL}$ - $\leq 82\text{fL}$	47	0.998
MCV: $> 70\text{fL}$ - $\leq 78\text{fL}$	29	0.994
FRC%: $> 10\%$ - $< 30\%$	119	0.995
FRC%: $\geq 30\%$	80	0.990

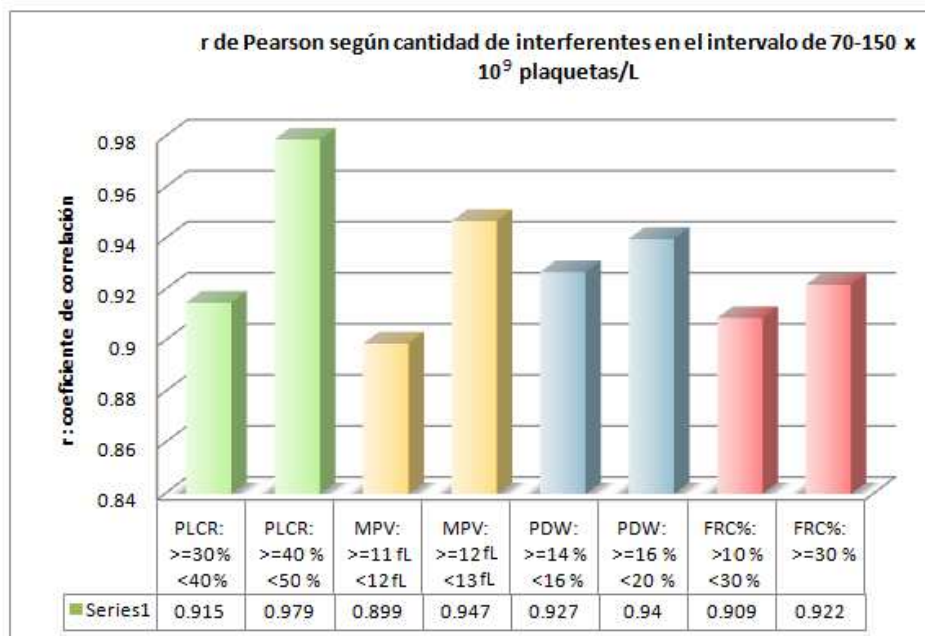
Cuando se evaluó el r sin importar el intervalo de recuento de plaquetas, este se vio sesgado obteniendo un r de de 0.99 en todos los casos sin importar la cantidad de interferente

Según intervalo de interferentes en el intervalo de $70-150 \times 10^9/\text{L}$

Intervalos por cantidad de interferente	Número de muestras	r en el intervalo $70-150 \times 10^9/\text{L}$
PLCR: $\geq 30\%$ - $< 40\%$	31	0.915
PLCR: $\geq 40\%$ - $< 50\%$	20	0.979
MPV: $\geq 11\text{fL}$ - $< 12\text{fL}$	18	0.899
MPV: $\geq 12\text{fL}$ - $< 13\text{fL}$	21	0.947
PDW: $\geq 14\text{fL}$ - $< 16\text{fL}$	24	0.927
PDW: $\geq 16\text{fL}$ - $< 20\text{fL}$	18	0.94
MCV: $> 78\text{fL}$ - $\leq 82\text{fL}$	ND	ND
MCV: $> 70\text{fL}$ - $\leq 78\text{fL}$	ND	ND
FRC%: $> 10\%$ - $< 30\%$	30	0.909
FRC%: $\geq 30\%$	11	0.922

ND: no determinado

Gráfico n°4



Este gráfico es una muestra de lo que sucede cuando se establecen rangos de interferentes, lo cual permite observar la tendencia de la correlación presentada, se concluye que hay variación del r . Sin embargo, se muestra la limitación de aplicar el r de Pearson para este análisis, el cual depende del rango de valores observado en la muestra, ya que, si se incluyen valores extremos el coeficiente de correlación aumenta. Así como se muestra en el caso del PLCR y MPV.

Para evitar esta limitación, es necesario utilizar un test de concordancia para variables cuantitativas, como por ejemplo el coeficiente de correlación intraclase, no obstante el hecho de que se trate de una prueba paramétrica limita su uso, debido a que no se puede asumir que los datos patológicos se ajusten a una distribución conocida. Es por ello que es conveniente utilizar otro tipo de análisis de concordancia entre los dos métodos de recuento plaquetario, el cual es el test de Bland – Altman.

5. Análisis de regresión lineal del método de citometría de fluorescencia en comparación al método de impedancia en muestras normales y patológicas

CITOMETRIA DE FLUORESCENCIA (PLT-O)					
<i>INTERFERENTE</i>	<i>Intervalo de plaquetas ($\times 10^9/L$)</i>	<i>N</i>	<i>SLOPE</i>	<i>INTERCEPT</i>	<i>R²</i>
FRC%>10%	70-150	45	1.028	-0.689	0.814
	150-450	126	1.144	-22.31	0.963
MPV>11fL + P-LCR>30fL	70-150	42	0.970	5.926	0.849
	150-450	38	1.292	-53.32	0.944
PDW>14% + MPV>11fL	70-150	26	0.893	15.68	0.845
	150-450	25	1.313	-53.69	0.960
MPV>11fL	70-150	39	0.983	3.533	0.854
	150-450	39	1.293	-52.77	0.952
NORMAL	150-450	232	1.019	6.555	0.939

Si el recuento de plaquetas por impedancia en muestras normales es cero el recuento óptico será de 6.55 (intercepto) .En contraste, el intervalo de $150-450 \times 10^9$ de muestras patológicas el intercepto tiene signo negativo para todos los casos.

Las pendientes en todos los casos evaluados tienen signo positivo por lo que la relación que existe es proporcional. Además se vio que en el caso de muestras con interferentes la pendiente más alejada de la unidad fue de 1,313 en el caso de las muestras con recuento entre $150-450 \times 10^9/L$ e interferentes de PDW>14% + MPV>11 fL.

El coeficiente de determinación (R^2) es de 0.939 en el grupo normal y es menor con respecto al grupo con interferentes evaluados en el intervalo de $150-450 \times 10^9/L$: En el caso de las muestras con FRC%>10% es de 0.963; MPV>11fL es de 0.952; igualmente en los patológicos agrupados el R^2 es ligeramente mayor (Ver gráfico 5 y 6).

Gráfico nº5

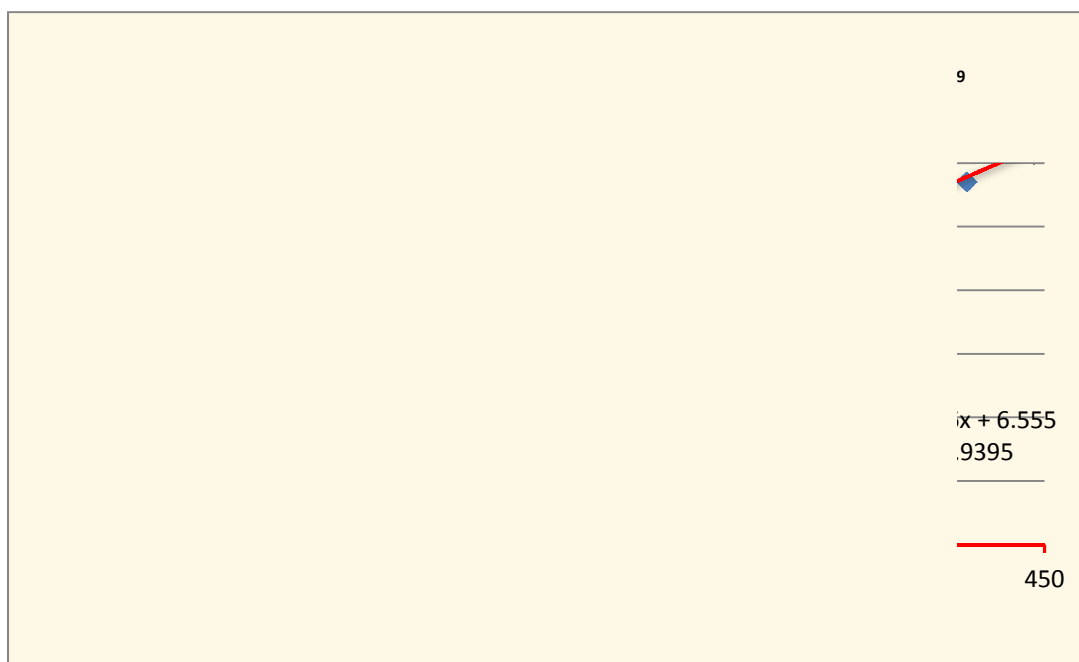
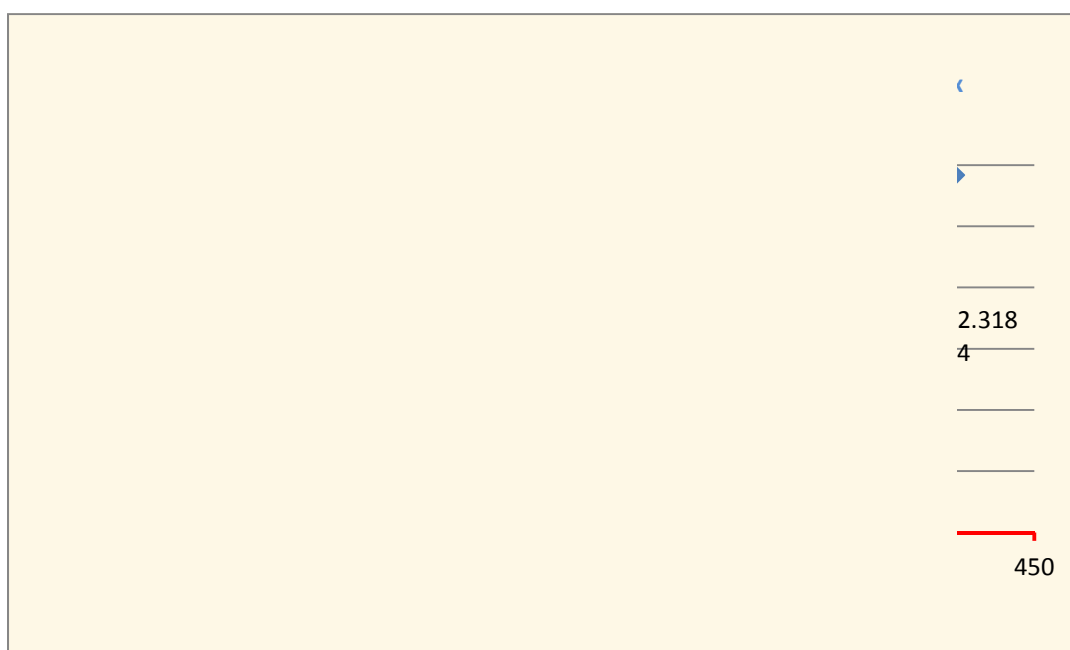
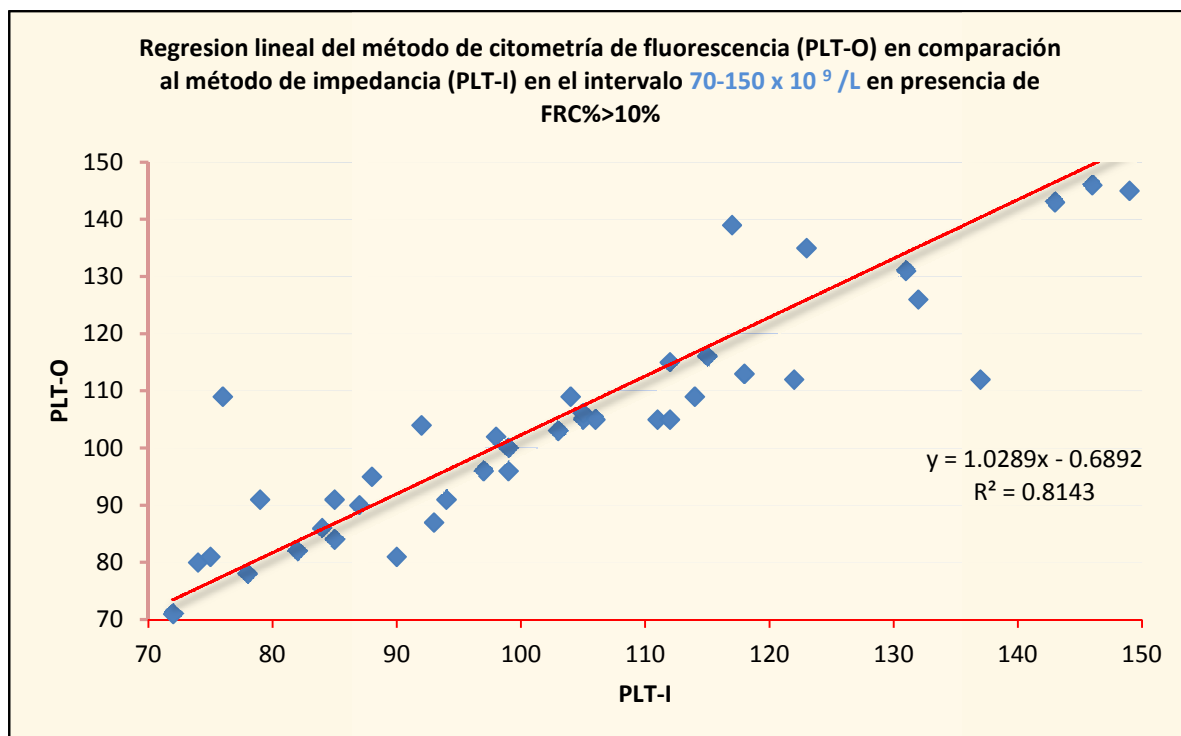


Gráfico nº6



No obstante, en el intervalo de 70-150 x 10⁹/L los interceptos tienen signo positivo (a excepción del grupo con FRC%>10%). Además, en este grupo los R² se han visto disminuidos, siendo el menor el grupo con FRC%>10% (R² = 0.814). (Ver gráfico nº 7)

Gráfico n°7



6. Test del Chi-cuadrado para estudiar la asociación del error elevado (>15) entre los recuentos de plaquetas mediante citometría de fluorescencia e impedancia, y la presencia de interferentes cualitativos:

Se procedió a realizar este análisis en el intervalo de plaquetas de $150 - 450 \times 10^9/L$, por el motivo de que el grupo normal, con seguridad, no presenta interferentes y además carecen de los interferentes cualitativos (ausencia de alarma).

Test del Chi-cuadrado para agregados plaquetarios (platelet clumps)

Se estableció una tabla de contingencia para dos variables dicotómicas de 2×2 ; y las respectivas hipótesis alternativas:

Agregados plaquetarios	ERROR ABSOLUTO $>15 \times 10^9/L$	
	Presente	Ausente
Presente	48	34
Ausente	91	141

H_0 : no hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de agregados plaquetarios

H_a : hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de agregados plaquetarios.

Luego se muestran los valores esperados:

Tabla de contingencia para estudiar la asociación del error elevado entre recuentos y la presencia de platelet clumps (agregados plaquetarios)			
	Recuentos con alto valor absoluto de $e > 15 \times 10^9/L$		total
	si	no	
platelet clumps	48(36.3)	34(45.7)	82
sin platelet clumps	91(199.1)	141(250.6)	232
	139	175	314

Los valores esperados están entre paréntesis

Finalmente:

Grados de libertad	1
Estadístico χ^2	9.158
Estadístico χ^2 corrección yates	8.393
α	0.005
Valor crítico	7.88

La aplicación del test para determinar el estadístico χ^2 permitió saber que es probable la relación de dependencia entre los agregados plaquetarios y el alto error entre recuentos, de este modo se encontró, para un $\alpha=0.005$ y un grado de libertad, que el estadístico corregido es de $\chi^2 = 8.393$ el cual es mayor al valor crítico de 7.88 encontrado en la tabla de distribución Chi-cuadrado. Por lo tanto en vista de los resultados, se rechazó la hipótesis nula (H_0) y se aceptó la hipótesis alternativa (H_a) como probablemente cierta.

Test del Chi-cuadrado para fragmentos

Se estableció una tabla de contingencia para dos variables dicotómicas de 2x2; y las respectivas hipótesis alternativas:

Fragments?	ERROR ABSOLUTO $>15 \times 10^9/L$	
	Presente	Ausente
Presente	21	23
Ausente	91	141

H_0 : no hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de fragments?

H_a : hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de fragments?

Tabla de contingencia para estudiar la asociación del error elevado entre recuentos y la presencia de fragments (fragmentos celulares)			
	Recuentos con alto valor absoluto de $e > 15 \times 10^9/L$		
	SI	NO	TOTAL
fragments	23(18.17)	21(25.82)	44
sin fragments	91(95.82)	141(136.17)	232
	114	162	276

Los valores esperados están entre paréntesis

La aplicación del test de chi cuadrado no se aplicó en la evaluación de fragmentos celulares debido a lo reducido de la muestra y que los valores esperados en los cuatro casilleros de la tabla de contingencia no son superiores en 5 unidades. Para este caso lo recomendable sería el uso del test exacto de Fisher para muestras demasiado pequeñas.

Test del Chi-cuadrado para PLT abn distribution

Se estableció una tabla de contingencia para dos variables dicotómicas de 2 x 2; y las respectivas hipótesis alternativas:

Distribución anormal plaquetaria	ERROR ABSOLUTO $>15 \times 10^9/L$	
	Presente	Ausente
Presente	3	1
Ausente	91	141

H_0 : no hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de distribución anormal plaquetaria

H_a : hay asociación entre el alto error entre recuentos y la presencia de distribución anormal plaquetaria

Tampoco fue posible aplicar este estadístico en la evaluación de Distribución anormal plaquetaria, debido a que en las 1305 muestras evaluadas esta alarma se observó solo en 95 muestras, y la mayoría en el intervalo $< 70 \times 10^9/L$ y no en el intervalo $150-450 \times 10^9/L$ (ver resultados N°1, y anexo 10)

7. Test de Bland-Altman para evaluar la concordancia entre los recuentos de plaquetas obtenidos por las metodologías de citometría de fluorescencia e impedancia en presencia de interferentes:

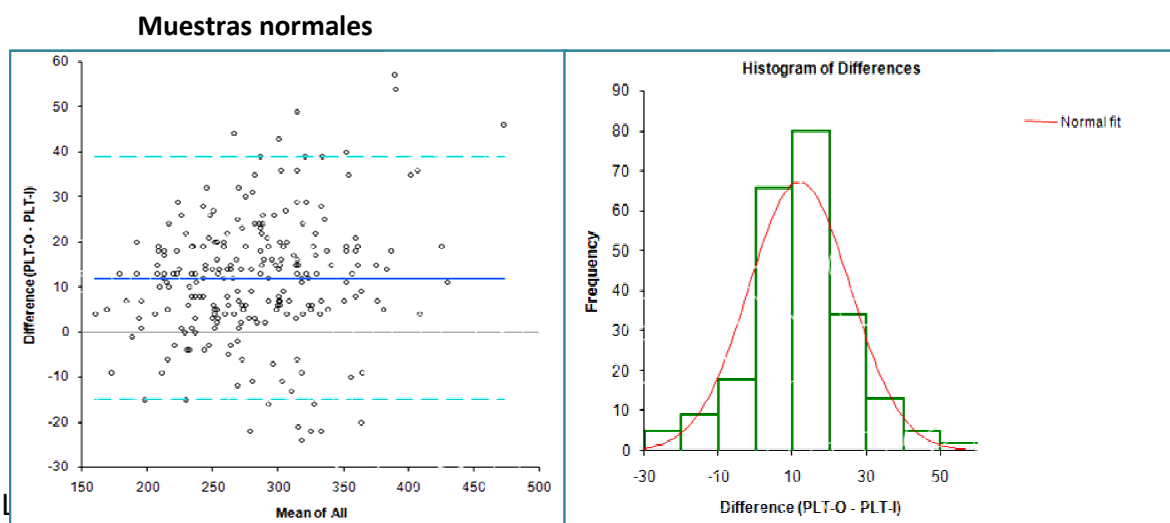
Los resultados obtenidos mediante la aplicación de la prueba de concordancia se muestran en el siguiente cuadro:

Test de Bland – Altman para evaluar la concordancia entre el PLT-I y PLT-O en el intervalo de $150-450 \times 10^9$ plaquetas/L				
	n	BIAS	LC al 95% bajo	LC al 95% alto
NORMAL	232	12	-15	38.9
P-LCR>30%	52	10.4	-30.5	51.3
MPV>11%	39	11.8	-32.9	56.5
PDW>14%	52	13.6	-26.1	53.2
MCV<82fL	34	17	-15.8	49.7
FRC%>10%	126	16.5	-24.2	57.3
Agregados plaq.	82	23.2	-22.5	68.9

Bias: promedio de la diferencia (línea azul); LC: limite de concordancia (líneas punteadas celestes)

Los gráficos obtenidos “*difference plot*”, mediante el test de Bland - Altman tanto para las muestras normales, como las muestras con interferentes se muestran abajo (el histograma de diferencias sólo se muestran en el caso de muestras normales):

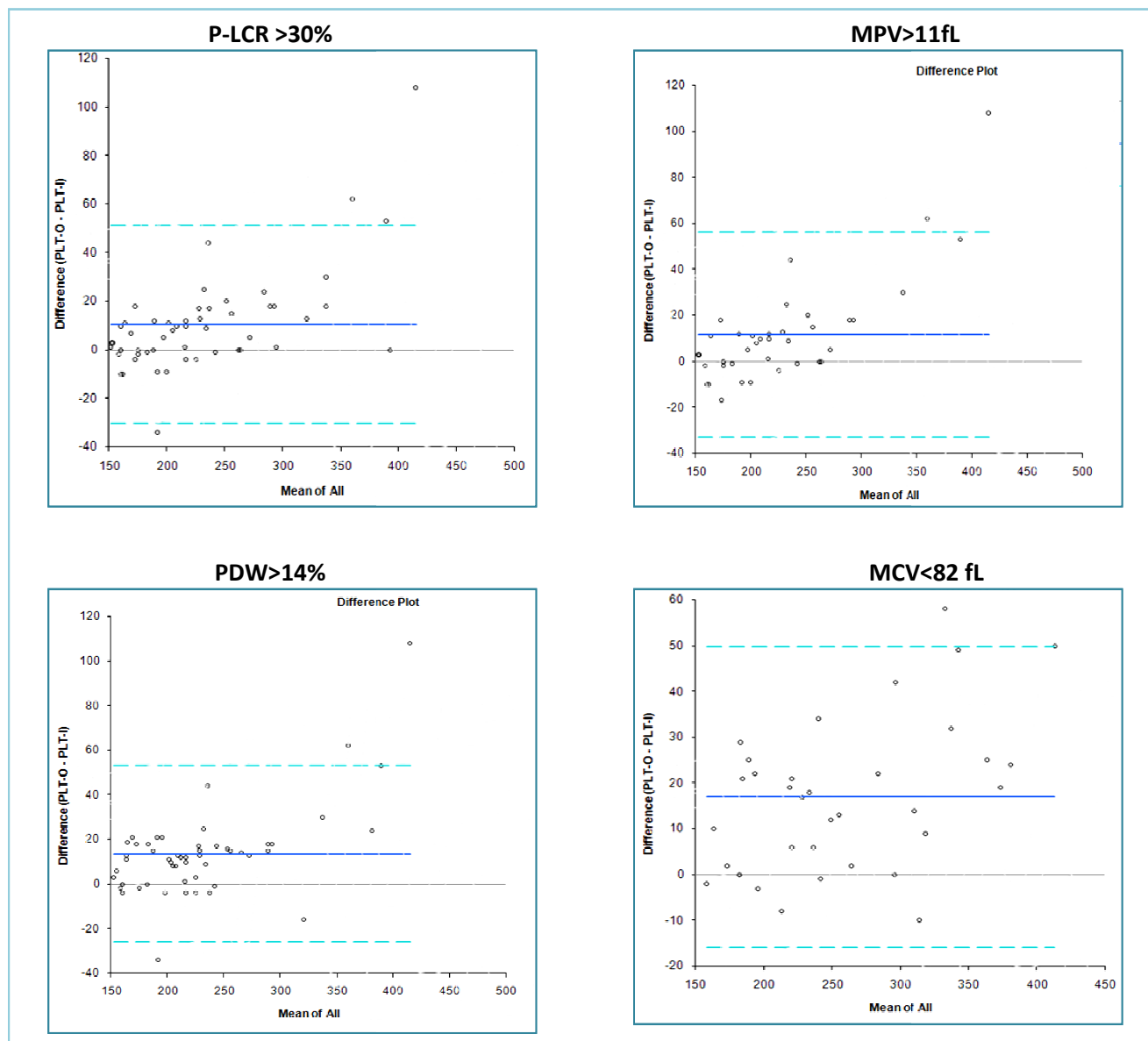
Gráfico n°8



El gráfico 8 muestra que la mayoría de diferencias cae alrededor de 10×10^9 plaquetas/L (bias) , y además se observa en el cuadro de límites de concordancia, que

en el caso de muestras sin interferentes los LC tanto alto como bajo son los más bajos. Es necesario resaltar que a pesar de que la muestra no contiene interferentes, el método óptico tiene a sobreestimar, esto se puede corroborar gráficamente con el histograma mostrado en el que la frecuencia de resultados positivos es mayor a la de los resultados negativos.

Gráfico n°9



Los interferentes relacionados a plaquetas grandes (P-LCR, MPV y PDW) tienen los bias y limites de concordancia más reducidos con respecto a todos los interferentes evaluados.

Además de observa una característica constante en las 4 gráficas: la nube de puntos tiene la tendencia a estar por arriba de cero, incluso en muestras con microcitosis.

Gráfico n°10

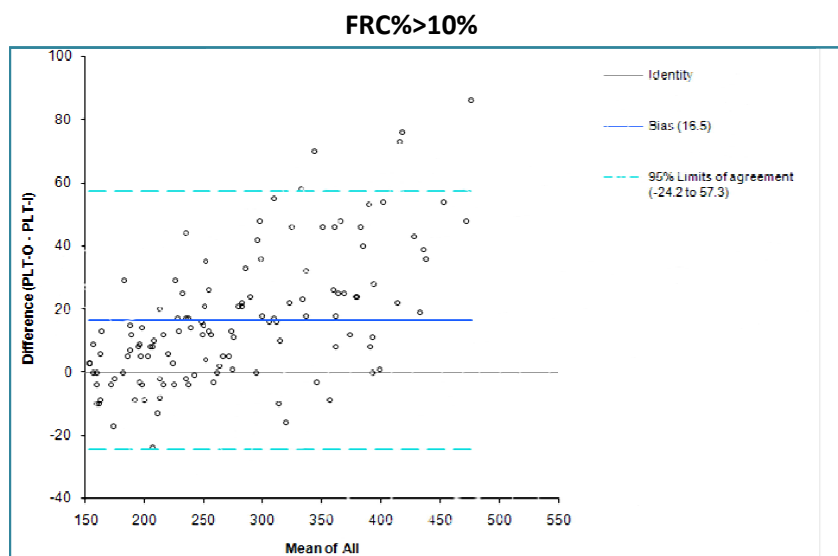
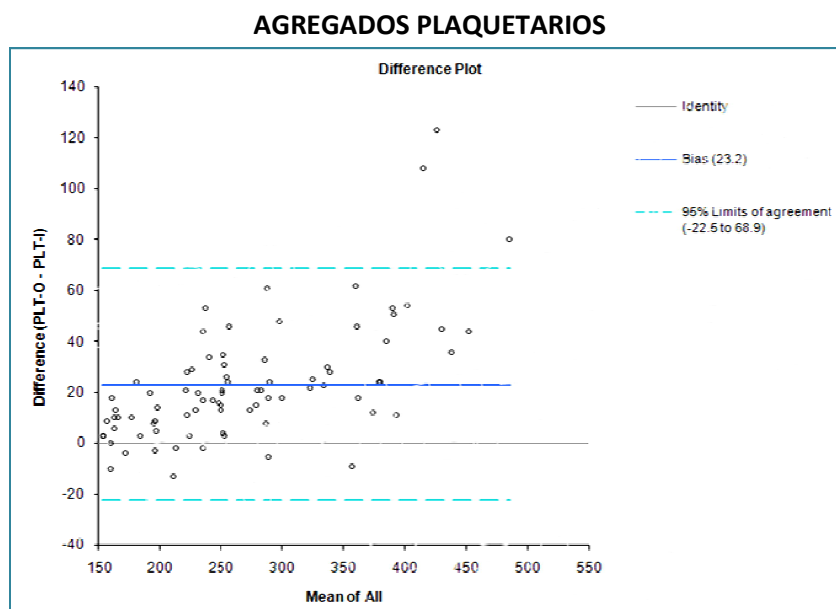


Gráfico n°11



Finalmente, la aplicación del Test de Bland – Altman en muestras con agregados plaquetarios mostró el bias ($23.2 \times 10^9/L$) y límites de concordancia al 95% más elevados de los interferentes evaluados.

DISCUSIÓN

DISCUSION

Las principales metodologías de recuento de plaquetas son el recuento en cámara de Neubauer, la impedancia, la citometría de fluorescencia y la citometría de flujo mas anticuerpos antiplaquetarios. Dentro de éstos los más utilizados son tanto la impedancia como la citometría de fluorescencia. El método de inmunoplaquetas no es utilizado de rutina por el elevado costo de los anticuerpos monoclonales, y de la necesidad de un citómetro de flujo. El recuento en cámara se deja de lado por su imprecisión y lo laborioso del procedimiento, tener un microscopio de contraste de fase y la experiencia del analista para realizarlo.

Por tanto la mayoría de laboratorios utilizan analizadores hematológicos basados en impedancia o citometría de fluorescencia en el trabajo de rutina. Estos principios tienen limitaciones las cuales se hacen notar mejor en muestras trombocitopénicas.

La inexactitud del recuento de plaquetas automatizado en muestras trombocitopénicas está bien documentado (Harrison, 2001; Briggs, Kunka y Machin, 2004)

El VPM tiene un rango de 6-10 fL, pero los analizadores basados en impedancia analizan partículas en un rango de 2 a 20 fL ,y de acuerdo a la curva ,el punto para discriminar plaquetas de hematíes sea los 36 fL .Los “flags” son emitidos en casos en que el equipo no tiene la capacidad de discriminar plaquetas de hematies.

El recuento óptico del analizador hematológico SYSMEX 2100 XE tiende a sobreestimar el recuento plaquetario con mayor intensidad que la impedancia, así lo demuestra el estudio multicéntrico titulado “Accuracy of platelet counting Haematology analyzers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusión”. Sysmex menciona la superioridad del recuento óptico, sin embargo cuando se obtiene la diferencia del recuento óptico y el recuento de impedancia (error absoluto) -como se procedió en este estudio- en muestras normales, es decir sin interferentes, el recuento óptico en promedio fue mayor, de igual manera en muestras patológicas.

Los resultados de este estudio demuestran que realizar un análisis de muestras de personas sanas y patológicas es diferente debido a la presencia de interferentes. Este estudio separa las muestras según la presencia de un determinado interferente lo que me permite tener resultados más concretos que otros estudios debido a

que se hace uso de muestras patológicas sin tomar en cuenta el interferente particular que tengan. Respecto al *Segundo Reporte* realizado por la *División Científica de la Corporación Sysmex* (Tanaka C.; Fujimoto K.) en el que realizan su análisis sobre 28 muestras que tienen diversas características que pueden aumentar o disminuir el recuento de plaquetas, macroplaquetas, esquistocitos, muestras de pacientes con sospecha de CID (coagulación intravascular diseminada), además del error de no considerar la evaluación en un determinado intervalo de plaquetas, finalmente obtienen un coeficiente de correlación de 0.996, el cual por las razones antes citadas es limitado. El R^2 de este estudio, en el intervalo $150-450 \times 10^9/L$ esta, dependiendo del interferente de la muestra, entre 0.939 a 0.963; y en el intervalo de 70-150, el R^2 está entre 0.814 y 0.854.

Si se tiene una muestra de un paciente que está realizando hemolisis intravascular, se van a producir esquistocitos o fragmentos de hematíes, que asemejen al tamaño de una plaqueta. El fundamento de la impedancia al final del proceso se expresa de manera gráfica en un histograma, que es una relación de frecuencia (número de plaquetas) y tamaño de las plaquetas (MCV), como sólo esta última característica es evaluada, un fragmento de hematíe fácilmente podría ser considerada una plaqueta. De igual manera, la impedancia cuenta con los denominados discriminadores altos y bajos, lo cual limita la figura del histograma para considerar a una partícula como plaqueta. Sin embargo, en muestras con trombocitopenia, suele suceder que se presenten plaquetas de tamaño más grande de lo común que escaparían fuera del discriminador alto, por lo que no serían contabilizadas; con respecto a esto mediante el histograma de plaquetas hay una zona en el discriminador alto que le permite contabilizar las macroplaquetas (P-LCR) hasta los 30fL, pasado esto no la contabilizaría. Como demuestra el estudio Segal H.C., las plaquetas ópticas tienden a sobrestimar el recuento, sin embargo por fluorescencia incluirían también a las macroplaquetas. No obstante en este estudio la DS de PLTO-PLTI es mayor en muestras con macroplaquetas >30% que en muestras normales, la DS aumenta más cuando se le suma la característica de MPV>11 fL (el cual es un volumen relativamente grande con respecto al volumen promedio de las plaquetas normales), y si a ello se le suma la característica de PDW>14% la DS sigue aumentando aun más, lo que hace pensar que las muy gigantes no son contadas por impedancia, pero si por citometría de fluorescencia, comenzando de la premisa de que el recuento óptico sobrestima. Este resultado es similar al estudio reportado por Kristian M. Bowles (20), en el que menciona que en muestras con TPI (púrpura trombocitopénica idiopática), en el que se presentan frecuentemente con macroplaquetas, el recuento mediante el método de impedancia

tiende a subestimar el recuento por inmunofluorescencia -el recuento que tiene mejor correlación con el actual metodo de referencia. Además hacen la hipótesis que las discrepancias entre el método de inmunofluorescencia e impedancia pueden ser predecida por el PDW y el MPV debido a que las macroplaquetas son resultado de una reducción de la sobrevivencia de la plaqueta. Claramente este estudio corrobora esta afirmación, debido a que éstas constante plaquetarias influyen mucho en el recuento de plaquetas por impedancia y citometría, ya que en muestras con $PDW > 14\%$ mas $MPV > 110$ el error promedio de PLTO-PLTI fue de 18.28 y una DS de 23.05 (la DS mas alta producida por los interferentes evaluados en mi estudio) frente a un promedio de 11.96 y DS de 13.76 de muestras sin macroplaquetas (normales).

Este estudio se caracteriza por utilizar a paciente con entidades hemato-oncológica, a diferencia del estudio interlaboratorial realizado por Paul Harrison y Kenneth A. Ault (7) el que usa muestras residuales de pacientes recogidos con fines de otros ensayos clínicos y procesados dentro de las 6 horas después de la colección. De igual manera el estudio realizado por K.H. Hong y M.J. Kim utilizaron 165 muestras en el que las enfermedades específicas o condiciones del paciente no fueron consideradas como criterios de inclusión o exclusión. Otro estudio realizado por Linda M. Sandhaus, Ebenezer S. Osei (15) utilizan un total de 105 pacientes con entidades patológicas y en situaciones diferentes como son neoplasias hematológicas malignas, trasplantes de órganos, enfermedades hepáticas, renales, cardiovasculares y otros no mencionados.

Mencionar este detalle es importante ya que por tratarse de pacientes oncológicos podemos suponer que el paciente se encuentra bajo quimioterapia en la mayoría de los casos y por ende hay fragmentos de leucocitos los cuales no alteran el recuento de impedancia, como se observa en el estudio realizado por Dijkstra-Tiekstra y Van Der Schoot (36), en el que utilizan un analizador SYSMEX K-1000, basado en impedancia, para realizar recuentos de plaquetas en concentrados plaquetarios obtenidos por diferentes métodos y la vez contar fragmentos de leucocitos. Los fragmentos y el recuento de plaquetas fueron menos mediante el método de PRP (plasma rico en plaquetas) y más en los método de BC (Buffy coat). El aumento de plaquetas no se debe a que la impedancia conto a los fragmentos de leucocitos como plaquetas, sino se debió a que el método PRP por el factor centrifugación concentró menos plaquetas y eso se evidencia porque hubo menor destrucción de leucocitos y por lo tanto menos fragmentos de los mismos, a diferencia del BC que concentró mas plaquetas por la centrifugación

utilizada, y destruyó mas leucocitos, por ello estos aumentaron y no por un pseudo recuento plaquetario (33).Dentro de las entidades hemato-oncológicas considero leucemias y linfomas, estos últimos cuando están en su fase leucémica producen fragmentos citoplasmáticos tanto al momento del diagnóstico como durante la quimioterapia (26).

El estudio actual comprueba y demuestra que el recuento óptico sobreestima el recuento plaquetario. Lo comprueba de esta manera; tanto el recuento de plaquetas fundamentado en la impedancia como en citometría de fluorescencia (plaquetas ópticas) correlacionan muy bien con el método de referencia (RBC/Platelet Ratio utizando anti CD41 y anti CD 61),y que la Corporación Sysmex le atribuye a las plaquetas ópticas ser mejor que la impedancia en recuento bajos y en la capacidad de discriminar interferentes como microcitos , fragmentos de hematíes y discernir macroplaquetas.

Ante esta “ventaja” de las plaquetas ópticas, en una muestra con interferentes la impedancia debería tener un recuento mayor de plaquetas debido a que al verdadero valor se le sumaria los interferentes microcitos y fragmentos de hematíes, mas no en el recuento óptico. Por tanto, los resultados en muestras con interferentes microcitos, fragmentos de hematíes deberían ser mayores en la impedancia que en el método óptico.

Sin embargo, en 101 muestras con microcitos (Volumen Corpuscular medio menor a 82 fL) y 199 muestras con un porcentaje de fragmentos de hematíes mayor 10% con recuentos plaquetarios categorizados por intervalos. Se realizaron recuentos sobre estas muestras con el SYSMEX 2100 XE, tanto en su modo óptico e impedancia, y se hallo el error absoluto (e). Por la ventaja del método óptico en esta situación se lo tomó como recuento exacto, entonces el error absoluto es en esta situación fue de: $e = PLTI - PLTO$. Luego de obtener los errores absolutos para el total de muestras, se obtuvo los promedios de los errores: por intervalos, e independiente del recuento de plaquetas, y se obtuvo lo siguiente: Los resultados muestran que el recuento óptico es mayor que la impedancia en muestras con microcitos y fragmentos debido a que casi todos los promedios de errores parciales (por intervalos) y total muestran signo negativo.

Además se comparó el porcentaje de error por exceso y por defecto para el método de impedancia con respecto al tomado como exacto, el recuento óptico. Se observó en el gráfico que el error por defecto es mayor (87.1%), a pesar que debería ser menor a éste por la presencia del interferente microcitos; y el error por defecto en presencia de

fragmentos fue 71.4% es decir, el recuento óptico sobreestima el recuento por impedancia en una cantidad considerable de resultados.

Se publicó en el volumen 26 de la revista *Clinical & Laboratory Haematology* el año 2004 una carta al editor: "The most accurate platelet count on the Sysmex XE-2100. Optical or impedance?". En dicha carta se hace mención a la inadecuada práctica laboratorial de eliminación del algoritmo de conmutación y el reajuste que se realiza, para solo tomar en cuenta que el principio óptico es el más adecuado cuando el recuento plaquetario es menor a $50 \times 10^9/\mu\text{L}$. Sin embargo en el estudio que realizaron, llegan a la conclusión que para recuentos bajos, por ejemplo menor a $20 \times 10^9/\mu\text{L}$, en el Sysmex 2100 XE, el principio óptico no siempre da el mejor reporte, ya que en 269 muestras de pacientes con entidades hematológicas malignas y que presentaron Flags, el algoritmo de conmutación reportó al modo óptico en 39% de muestras y al modo de impedancia en 61%(4), teniendo mejor correlación con el método de referencia en caso que hubiera reportado la metodología contraria. Sin embargo en mi estudio, en 82 muestras, con entidades hemato oncológicas, que presentaron el Flag: plt abn distribution (distribución anormal plaquetaria) y recuento plaquetarios menor a $70 \times 10^9/\text{L}$, el algoritmo de conmutación sólo una vez reportó como el mejor recuento a la impedancia, para las otras 81 muestras el recuento óptico fue reportado, teniendo en cuenta que estas muestras potencialmente puedan presentar fragmentos de leucocitos (anexo 10).

Fragmentos de hematíes, fragmentos de leucocitos, macroplaquetas, microcitos, plaquetas degranuladas, gotitas de grasa, satelitismo plaquetario, agregados plaquetarios entre otros son considerados como interferente en el recuento de plaquetas debido a que comparten ciertas características similares a las plaquetas al ser analizadas por determinada metodología, Zandecki M. & Genivieve F.(26)

El estudio presentado por E. Maurer-Spureg (34) demuestra que el analizador SYSMEX XE-2100 reporta erróneamente un alto recuento de plaquetas en el modo óptico cuando la sangre contiene partículas que caen en el rango del tamaño de las plaquetas. A un total de 14 muestras se le agregó partículas de látex para imitar contaminantes, los resultados obtenidos fueron que a diferencia de la impedancia del SYSMEX XE-2100, el analizador ADVIA 120 y el modo óptico sobreestimaron los recuentos, en este último fue mayor. En este caso, a pesar que esas partículas no son fisiológicas comprueban que el recuento óptico es susceptible a interferentes por lo que tiende a sobreestimar la mayoría de veces

los recuentos plaquetarios lo cual coincide con lo resultados mostrados en el Anexo 14: grafico nº15, de esta investigación.

Los resultados de este estudio discrepan con la afirmación realizado por Briggs y Harrison: "*The use of the `optical' platelet count significantly improves the reliability of low platelet counts*" (39)

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Del estudio de interferentes en el recuento plaquetario mediante impedancia y recuento óptico /fluorescente (Optical Light scatter/ fluorescence) en el analizador SYSMEX XE 2100 en muestras de pacientes hemato-oncológicos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. En muestras normales, la desviación estándar (DS) en el intervalo de 150-450 $\times 10^9$ /L es menor que en muestras con los interferentes evaluados siendo la DS mínima en muestras con MCV<82 fL de 16.71, y DS máxima en PDW>14%+MPV>11fL
2. Al evaluar el tamaño de la plaqueta y obtener tanto un MPV, PDW y P-LCR alto, la DS del error absoluto del recuento óptico con respecto a la impedancia, es mayor en contraste a los demás interferentes evaluados
3. Cuando se evalúa el MCV muy bajo (microcitos: MCV<82fL) como interferente, mediante el método óptico respecto a la impedancia, la DS del error absoluto es mínima, y la concordancia en el análisis de diferencias individuales (PLTO – PLTI) mayoritariamente están por arriba de cero.
4. La fuerza de correlación es buena entre la citometría de fluorescencia con la impedancia en el intervalo normal, en presencia de interferentes y sin estos.
5. La correlación entre los métodos PLT-O y PLT-I en muestras trombocitopénicas (intervalo de plaquetas: 70 – 150 $\times 10^9$ /L) disminuye en presencia de interferentes. Los interferentes que produjeron disminución en la correlación fueron P-LCR >30% y VPM >11fL ($R^2=0.854$). Cuando éstos estuvieron presentes en simultáneo en la

muestra, la correlación disminuyó levemente ($R^2=0.849$). Sin embargo, se observó que los fragmentos de hematíes (FRC%) >10 % son los que producen mayor disminución en la correlación ($R^2=0.814$).

6. En el análisis de regresión lineal, el método óptico mostró la pendiente más alejada de la unidad en el caso de las muestras con recuento entre $150-450 \times 10^9/L$ e interferentes de $PDW > 14\% + MPV > 11 fL$
7. La aplicación del test del chi cuadrado permitió corroborar que la presencia de los agregados plaquetarios producen un error mayor a 15×10^9 plaquetas/L en el recuento de plaquetas.
8. La concordancia entre los métodos evaluados se vio afectada por los interferentes evaluados, siendo los fragmentos de hematíes y agregados plaquetarios los que produjeron mayor discordancia.
9. La citometría de fluorescencia tiende a sobrestimar el recuento de plaquetas incluso en muestras normales.

CONCLUSION FINAL

El estudio ha demostrado que en presencia de los interferentes evaluados, el recuento plaquetario obtenido por las dos metodologías del SYSMEX 2100 XE se ha visto claramente influenciado por éstos, específicamente los recuentos obtenidos por el método óptico en muestras trombocitopénicas y provenientes de pacientes con alguna entidad hemato-oncológica.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos en el estudio, veo por conveniente recomendar determinados criterios en la realización del recuento de plaquetas en muestras patológicas :

1. Utilizar el Sysmex 2100 XE en modo impedancia (con uso del enfoque hidrodinámico) para muestras trombocitopénicas de pacientes con entidades hemato oncológica debido al riesgo de una alta sobrestimación en el recuento de plaquetas mediante el método óptico.
2. Tomar en cuenta las alarmas que emite el equipo (agregados plaquetarios, fragmentos, distribución anormal plaquetaria, macroplaquetas) con respecto al recuento de plaquetas, especialmente en muestras trombocitopénicas.
3. Tener en cuenta el diagnóstico del paciente, y el estado que este presenta para tomar buen criterio al momento de validar resultados: por ejemplo hemólisis intravascular genera altos recuentos de fragmentos de hematíes; paciente oncológico bajo terapia citotóxica, fragmentos celulares o de leucocitos.
4. Realizar la lectura del frotis de sangre periférica es una necesidad para tener en cuenta los posibles interferentes que puedan influir en la metodología aplicada al recuento de plaquetas, además corroborar las alarmas emitidas por el equipo automatizado.
5. Evitar prolongar el tiempo de contacto de la muestra con el anticoagulante para no generar agregados plaquetarios, y agrandamiento de las plaquetas. Así como adquirir destreza para discernir en lámina periférica fragmentos de leucocitos de macroplaquetas, y precipitados del colorante.
6. Aplicar este estudio en enfermedades específicas o circunstancias particulares para obtener información acerca de la utilización correcta de qué metodología debería aplicarse en el recuento de plaquetas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IZAGUIRRE Raul: "El descubrimiento de las plaquetas" Rev. Biomed 1997; 8:197-208
2. F.KUBOTA: "Analysis of red cell and platelet morphology using an imaging-combined flow cytometer" Clin. Lab. Haem. 2003; 25, 71–76
3. GARCIA Mesa, Coma Cristina: "Características estructurales y funcionales de las plaquetas" Rev. Cubana Angiol y Cir Vasc 2000; 1(2):132-41
4. BRIGGS C., KUNKA S.,MACHIN S.J.: "The most accurate platelet count on the A XE-NE. Optical or impedance?" 2004, Clin. Lab. Haem 26, 157–158
5. BRECHER,G.,SCHNEIDERMAN,M&CRONKITE,EE.P: "The reproducibility of the platelet count".1953,American Journal of Clinical Pathology 23,15-21
6. HARRISON Paul, HORTON Allan: "Inmunoplatelet counting: a proposed new reference procedure". British Journal of Haematology, 2000, 108, 228-235
7. HARRISON Paul, KENNETH A., CHAPMAN S., : "An interlaboratory Study of a candidate Reference Method for Platelet Counting" Am J Clin Pathol 2001;115:448-459
8. ICSH, ISLH : "Platelet Counting by RBC/Platelet Ratio Method, A reference Method" Am J Clin Pathol 2001;115:460-464
9. GRANERO F. Mariel, GUILHERME S. Elias: "Definition of reference ranges for the platelet Distribution width (PDW):a local need", New York, Clin Chem Lab Med 2010;48(2):255–257
10. KABAKUS N.,YILMAZ B.: "Investigation of platelet aggregation by impedance and optic methods in children with iron deficiency anaemia" 2000, *Haematologia*, Vol. 30, No. 2, pp. 107–115 (2000)

11. HOFMAN R.A.,BRITT W.B.: "Flow System Measurement of Cell Impedance Properties".1979,The journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 27,N°1.pp 234-240

12. DUNN A., RICHARS CORTUM Rebecca: "Three-dimensional computation of Light Scattering From Cells" Journal of Quantum Electronics, vol. 2,N°. 4,1996

13. BRIGGS C.J., MACHIN S.J.: "Discrepancy between impedance and immunofluorescence platelet counting has implications for clinical decision making in patients with idiopathic thrombocytopenia purpura" Journal Compilation. 2006, British Journal of Haematology, 135, 408–417

14. HONG.H.K ,KIM M.J. : "Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet reference method, and estimation of possible inadequate platelet transfusion" International Journal of Laboratory Hematology. 2009, 31, 298–306

15. SANDHAUS L.M.,OSEI E.S. : "Platelet Counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100, and Advia 120 A Comparative Analysis: Using the RBC/Platelet Ratio Reference Method" Am J Clin Pathol 2002;118:235-241

16. SEGAL H.C.,BRIGGS C. : "Accuracy of platelet counting hematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impaction platelet transfusion", 2005 Blackwell Publishing Ltd, British Journal of Hematology, 128, 520–525

17. PATTERSON K. "Platelet parameters generated by automated blood counters" 1997. CME Bulletin Haematology 1,13-16

18. BRIGGS C., HARRISON P., MACHIN J.: "Continuing developments with the automated platelet count", Journal compilation, Int. Jnl. Lab. Hem. 2007, 29, 77–91

19. PEKELHARING J.M.,HAUSS O.: "Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults".2010;Diagnóstics Perspectives,Sysmex Corporation; Vol.1.Pag.1-11

20. BOWLES K.M., COOKE L.J. "Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia" 2005. Clinical and Laboratory Haematology 27,370-373.
21. BANFI G., SALVAGNO G.,: "The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes" Clin Lab Chem Med 2007. Vol 45:565-576
22. SYSMEX AMERICA LATINA: "Guía preparatoria para entrenamiento" 2005, documento No. XE1.EM, revisión 1
23. GRANERO F.M., GUILHERME S.E.: "Definition of reference ranges for platelet distribution width (PDW): a local need" 2010, Chem Lab Med. 48(2):255-257
24. SUGIMORI N., KONDO Y., SHIBAYAMA M.: "Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis" 2008. European Journal of Haematology. Vol 82: 54-60
25. KUNZ, D. "Possibilities and limitations of automated platelet counting procedures in the thrombocytopenic range". 2001. Seminars in thrombosis and hemostasis, 27, 229-235
26. ZANDECKI M., GENEVIEVE F.: "Spurious count and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets". International Journal of Laboratory Hematology. 2001, Vol 29: 4-20
27. SPRINGER W., VON RUECKER A. : "Difficulties in determining prophylactic transfusion thresholds of platelets in leukemia patients" Blood. 1998; 92: 2183-2184
28. CESCA C., BEN ESRA J.,: "Platelet satellitism as presenting finding in mantle cell lymphoma" Am J Clin Pathol 2001; 115:567-570

29. VAN DER MEER P., WILDT-EGGEN J.: "The effect of whole blood storage time on the number of white cell and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cell". 2006. Transfusion, vol.49: 589-594
30. NORBERG B., NILSSON T.K.: "Platelet clumping in Ph-negative myeloproliferative syndromes" 1987, Acta Medica Scandinavica 222, 459-464
31. BANNO S., ITO Y., TANAKA C., HORI T., : "Quantification of red blood cell fragmentation by the automated hematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation" 2005; Clin. Lab. Haem. 27, 292-296
32. JIANG M., SAIGO M., KUMAGAI S., IMOTO S., KOSAKA Y.: "Quantification of red blood cell fragmentation by automated haematology analyser XE-2100" 2001. 23, 167-172.
33. JIANG M., MATSUMOTO H., IMOTO S., SAIGO K., KUMAGAI S.: "Method for quantitatively analyzing fragmented red blood cell" 2003. Japanese Patent Application N° 2000-184853
34. MAURER-SPUREJ E., PITTENDREIGH C. : "Erroneous automated optical platelet counts in 1-hour post-transfusion blood sample" .2008. International Journal of Laboratory, 32, e1-e8
35. GUEVARA P.D.M, PERALTA G.F.A.: "Estudio de los métodos: automatizado, factor de estimación 20 000 y de Dameshek en comparación al método en cámara para el recuento de plaquetas en sangre venosa" 1999. Tesis para optar el título profesional de licenciado en Tecnología médica. Lima-Perú. UNMSM
36. DIJKSTRA-TIEKSTRA M.J., SCHOOT V.D.: "White blood cell fragments in platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma or buffy-coat methods" Vox sanguinis. 2005, Vol 88: 275-277
37. ALEGRE T.J., AVELINO C.A., GUTIERREZ G.J., LLANOS A.C., MUNAYCO C.S., MUSAYON H.R., PAZ Q.H., RODRIGUEZ T.R., VILLANUEVA P.L.: "Automatización

en el laboratorio de hematología” Diplomado Hematología y hemostasia aplicado al laboratorio clínico ,OCEC. Modulo VIII,. Pag.12-18

38. MICHELSON A.D.: “Platelets” 2007, Elsevier Second Edition
39. BRIGGS C, HARRISON P.: “New quantitative parameters on recently introduced automated blood cell counter-the XE 2100” 2000,Clin. Lab. Haem., 22, 345-350
40. DAVID B., BIGELOW NC. “Indirect immunoplatelet counting by flow cytometry as a reference method for platelet count calibration” Lab.Haematology.1999.15-21
41. VAN DER MEER W., MACKENZIE M.A. : “Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting”. 2003. Journal of Clinical Pathology 56, 772-774

ANEXOS

Anexo 1

MATERIALES

A. Artículos de oficina:

- Rotulador
- Calculadora
- Hojas bond
- Lapiceros
- Folder
- Tinta de impresión
- Computadora
- Impresora
- Grapas
- Cámara digital

B. Materiales para coloración:

- Lamina portaobjetos
- Lamina extensora
- Colorante Wright
- Buffer para coloración
- Lápiz de cera
- Aceite de inmersión
- Algodón
- Bencina
- Contómetros
- Cronometro
- Gradillas

C. Equipos:

- Microscopio de luz
- Analizador hematológico SYSMEX 2100 XE
- Software Tconv4 MFC
- Cámara fotográfica para microscopio de 2 pixeles

Anexo 2

PLAN DE PROCEDIMIENTOS

A. Desarrollo del instrumento de obtención de datos (ficha):

Anexo 3

B. Obtención de datos:

Para la realización de este estudio se conformaron 2 grupos: un grupo de muestras normales; y otro de muestras patológicas para obtener datos, y posteriormente cumplir con los objetivos del estudio.

Se utilizó el Software Tconv MFC para extraer la data de información de la muestras de donantes proveniente del Banco de sangre del INEN (grupo de muestras normales), del analizador hematológico automatizado SYSMEX 2100 XE de los meses abril, mayo del 2011.

Para el grupo patológico, se extrajo la data de información del analizador hematológico automatizado SYSMEX 2100 XE mensualmente, a partir del mes de enero hasta el mes de mayo del 2011, de la siguiente manera.

- Mensualmente, mediante la filtración de datos en Microsoft Office Excel 2010, se realizaba una búsqueda de muestras patológicas, mediante el código de nueve dígitos con que fueron rotuladas las muestras, que cumplan los criterios de inclusión propuestos para el estudio.
- Posteriormente, mediante el uso de el código de nueve dígitos se hacía un seguimiento a la muestra para obtener tanto el número lámina de frotís de sangre periférica como la historia clínica del paciente de quien se obtuvo la muestra, mediante los Software LabCore y Sysinen Patología, respectivamente.
- El número de lámina periférica, permitió encontrar el frotís en el archivo de láminas con no más de una semana de antigüedad (Solo para las muestras patológicas).
- Al personal Tecnólogo médico del laboratorio de Hematología, se entrego la ficha de recolección de datos, para que registren el número de plaquetas

en 1000 hematíes, y el hallazgo de artefactos o anormalidades morfológicas plaquetarias.

- Se completó el llenado de las fichas con los datos obtenidos del equipo automatizado

PROCEDIMIENTO:

1. Determinación de la muestra

PARA EL GRUPO NORMAL:

Las muestras de los donantes fueron procesadas en el analizador, y se obtuvo la información relacionada a plaquetas respectiva.

El total de muestras de pacientes normales es: **232**

PARA EL GRUPO PATOLÓGICO:

Se aplicó el software TCONV MFC en el analizador SYSMEX 2100 XE con la finalidad de obtener la data semanal de resultados.

ETAPA I: Primer filtrado, eliminar aquellos datos que presentaban las siguientes alarmas:

- @ (fuera de linealidad)
- alarma de ERROR INFO
- Códigos diferentes al formato **103053922** (el número en negrita indica el mes)

ETAPA II: Segundo filtrado, agrupar los datos según los siguientes parámetros:

Datos con parámetros cuantitativos:

- P-LCR (porcentaje de macroplaquetas)
- MPV (volumen plaquetario medio)

- PDW (amplitud de distribución plaquetario)
- RDW-CV (amplitud de distribución eritrocitaria)
- MCV (volumen corpuscular medio)
- FRC% (fragmentos de hematíes)

Datos con alarmas, parámetros cualitativos:

- Platelets clumps (agregados plaquetarios)
- Fragments (fragmentos celulares)
- Distribución anormal plaquetaria

ETAPA III: eliminación de datos según:

Valores menores a:

- P-LCR < 30%
- MPV <11 fL
- PDW <14%
- RDW-CV <14%
- FRC% <10%

Valor mayor a:

- MCV >82 fL

Al concluir la ETAPA III, se procedió a obtener los códigos para ser colocados en las fichas de recolección de datos, con la finalidad de obtener:

- Lámina de frotís de sangre periférica para el recuento de plaquetas y revisión
- Diagnóstico, se eliminaron aquellos que presentaban entidad no hemato oncológica, no presentaban diagnóstico y no presentaban registro

El total de muestras patológicas es: **1305**

Las entidades hemato oncológicas registradas se presentan en el anexo 8

2. Recuento plaquetario

A. Recuento de plaquetas por impedancia

El recuento plaquetario mediante esta metodología aplicada por el SYSMEX 2100 XE esta descrito en la “*Guía preparatoria para entrenamiento de los analizadores hematológicos automatizados Sysmex® serie XE*”:

- La sangre es aspirada de la pipeta de aspiración manual a la válvula de dosificación de muestra.
- 4.0 µL de sangre, medidos por la válvula de dosificación de muestra, son diluidos con 1.9960 mL de Cellpack® a una relación 1:500, y luego enviados a la cámara de muestra de hematíes como la muestra diluida.
- El pistón inyector envía lentamente 11.7 µL de muestra diluida al detector de plaquetas.
- El detector cuenta las plaquetas por medio del enfoque hidrodinámico (detección CD).

B. Recuento de plaquetas por citometría de fluorescencia (optical light scatter / fluorescence)

El recuento plaquetario mediante esta metodología aplicada por el SYSMEX 2100 XE esta descrito en la “*Guía preparatoria para entrenamiento de los analizadores hematológicos automatizados Sysmex® serie XE*”:

- La sangre es aspirada de la pipeta de aspiración manual a la válvula de dosificación de muestra.
- 4.5 µL de sangre, medidos por la válvula de dosificación de muestra, son diluidos con 0.8955 mL de diluyente RET SEARCH® (II), y luego enviados a la cámara de reacción como la muestra diluida.
- Al mismo tiempo, 18 µL de solución colorante RET SEARCH® (II) son añadidos para diluir la muestra a una relación de 1:204. Luego de reaccionar por aproximadamente 31 segundos en estas condiciones, la muestra diluida es teñida, convirtiéndose en la muestra para el análisis.

- El pistón inyector envía 2.8 µL de la muestra diluída teñida al bloque del detector óptico.
- En el bloque del detector óptico, la muestra es analizada por medio del método de citometría de flujo utilizando un láser semiconductor.

C. Recuento de plaquetas por metodología manual: Damesheck modificación de Fonio

- Una vez obtenido el frotís de sangre periférica se le adjudica a los participantes (tecnólogos médicos) para q realicen el recuento en él.
- Se realiza la búsqueda de zonas de lectura, donde los hematíes estén uniformemente distribuidos en una monocapa
- Luego, se realiza el recuento de plaquetas en un total de 1000 hematíes
- El número de plaquetas se multiplica por el hematocrito corregido (anexo n)
- El recuento fue realizado 2 veces en un intervalo de 3 horas por el mismo participante

3. Reporte de interferentes:

A. Reporte automatizado: mensajes anormales y de sospecha

a. *Mensajes anormales:*

- i. P-LCR +
- ii. Microcitos
- iii. PDW +
- iv. RDW-CV +
- v. MPV +

b. *Mensajes de sospecha:*

- i. Plaquetas clumps? : evaluado en el dispersograma IMI y NRBC
- ii. Fragments?:evaluado en el dispersograma RET
- iii. Distribución anormal plaquetaria?

B. Reporte de revisión en lámina periférica

a. Macroplaquetas

- b. Agregados plaquetarios
- c. Esquistocitos
- d. Fragmentos celulares
- e. Otros

Anexo 3

FICHA DE DATOS OBTENIDOS POR EL ANALIZADOR SYSMEX 2100 XE FULL Y EL RECuento MANUAL INDIRECTO PARA EL RECuento DE PLAQUETAS



El estado de la muestra será definido por el recuento basado en impedancia del analizador SYSMEX 2100 XE FULL, debido a que en diversos estudios realizados ^{14,15}, este método tiene mejor correlación con el actual método de referencia establecido por la ICSH/ISLH "RBC/platelet ratio"

A.-CARACTERISTICAS PREVIAS AL RECuento DE PLAQUETAS:										Fecha:				
1	Volumen de sangre en línea de referencia del tubo de toma de muestra					SI		NO						
2	Hora de toma de muestra		Hora/s antes de A-3			1	2	3	4	5	>5			
3	Hora de emisión de resultados por el Sysmex 2100 XE full													
4	Frotis con campos adecuados para el recuento					SI		NO						
B.-DATOS DEL PACIENTE														
1	Edad :		Sexo:	M	F	#muestra:		H.C.:		#lámina periférica:				
2	Entidad hemato-oncológica:													
C.-DATOS OBTENIDOS DEL RECuento DE PLAQUETAS:														
1	Estado de la muestra:													
	Trombocitopenia		Normal		Trombocitosis									
2	Número de plaquetas obtenidos por impedancia del Sysmex 2100 XE full										PLT-I:	x10 ⁹ /L		
3	Anormalidades en la curva de distribución:					SI		NO						
4	Histograma													
5	Número de plaquetas obtenidos por optical light scatter/fluorescence del Sysmex 2100 XE full										PLT-O:	x10 ⁹ /L		
6	Recuento validado por el algoritmo de conmutación; valor de corte: 70x10 ⁹ /L										PLT-I	PLT-O		
C.-INTERFERENTES:														
1	Número de fragmentos		#WBC-frag		#RBC-frag									
2	Alarmas del analizador													
	@	&	Platelet clumps		Large or giant platelet		Microcitic RBC							
3	Otros parámetros													
	VCM	VPM	P-LCR	PCT	PDW	HCTO								
D.-Recuento manual indirecto														
1	Primer analista		Licenciado		Firma									
	Número de plaquetas en mil hematíes(tiempo 1)													
	Número de plaquetas en mil hematíes(tiempo 2,tres horas después del primer recuento)													
2	Segundo analista													
	Número de plaquetas en mil hematíes(tiempo 1)													
	Número de plaquetas en mil hematíes(tiempo 2,tres horas después del primer recuento)													
3	Anomalías observadas en la lamina periférica													
	Macroplaquetas	Agregados plaquetarios	esquistocitos	Fragmentos celulares	otros									
	Especificar otros:													

Se considera trombocitosis cuando el recuento es mayor a 450x10⁹/L. Se considera trombocitopenia cuando el recuento es menor a 150x10⁹/L. Frag: fragmentos; VCM: volumen corpuscular medio; VPM: volumen plaquetario medio; P-LCR: porcentaje de células grandes de plaquetas; PCT: plaquetocrito. Citometría de fluorescencia (recuento óptico, optical light scatter/fluorescence); WBC: White blood cell; RBC: Red Blood Cell.

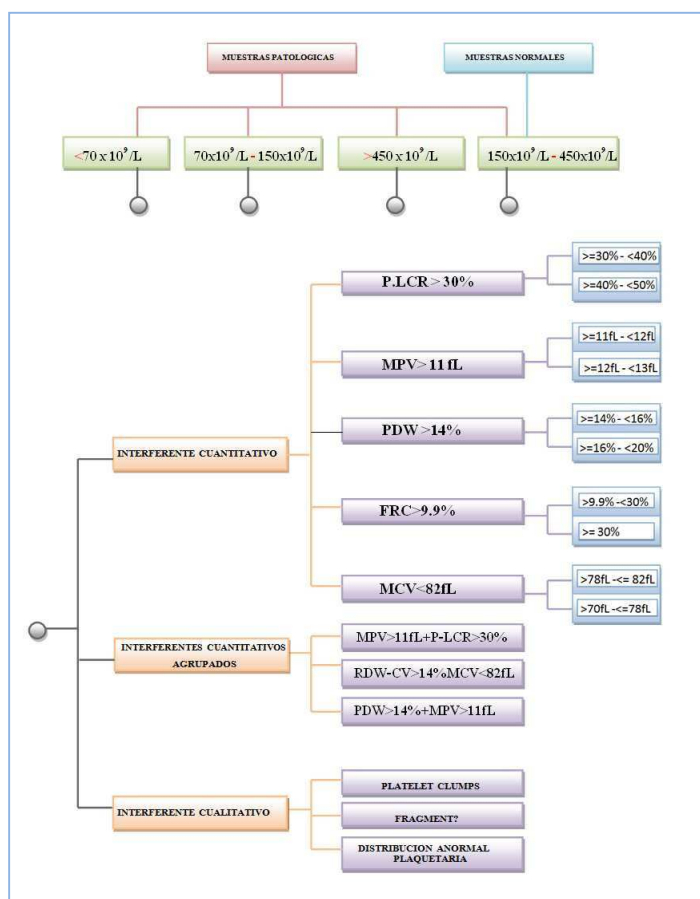
Anexo 4

ANALISIS DE DATOS

A. Registro y tabulación:

Los resultados obtenidos por los métodos tanto de impedancia como de citometría de fluorescencia, así como los interferentes reportados en el equipo fueron registrados mediante el software Tconv MFC y debidamente filtrado en hojas del programa EXCEL del sistema operativo Windows XP.

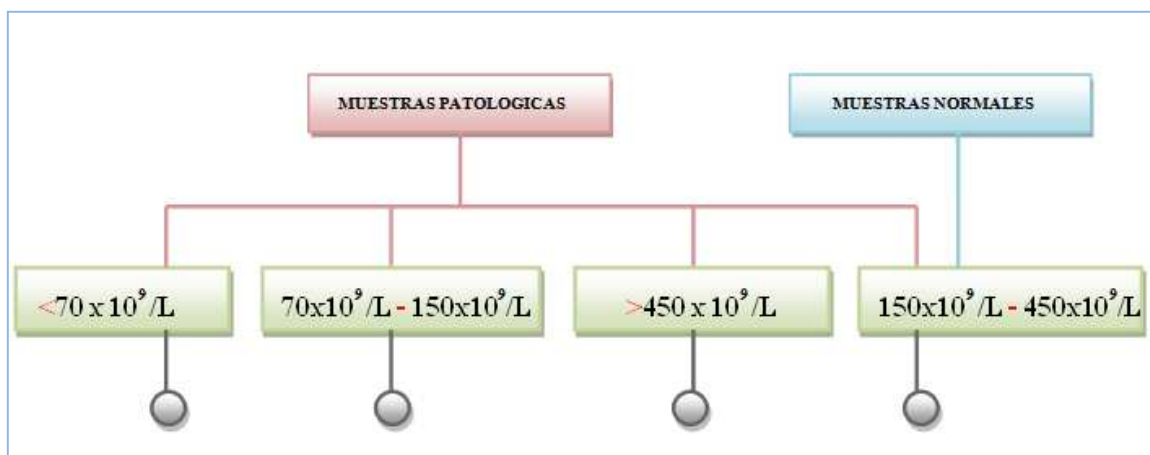
Los resultados obtenidos por el método manual de Dameshek (recuento de plaquetas y reporte de revisión), fueron registrados manualmente en fichas de recolección de datos especialmente diseñadas para la investigación (anexo 1) y luego, llevados en hojas del programa EXCEL del sistema operativo Windows XP.



B. Separación en intervalos de plaquetas[†]:

Los datos de recuento de plaquetas se clasificaron en 4 intervalos para su posterior análisis según el recuento de plaquetas por impedancia. Los intervalos fueron:

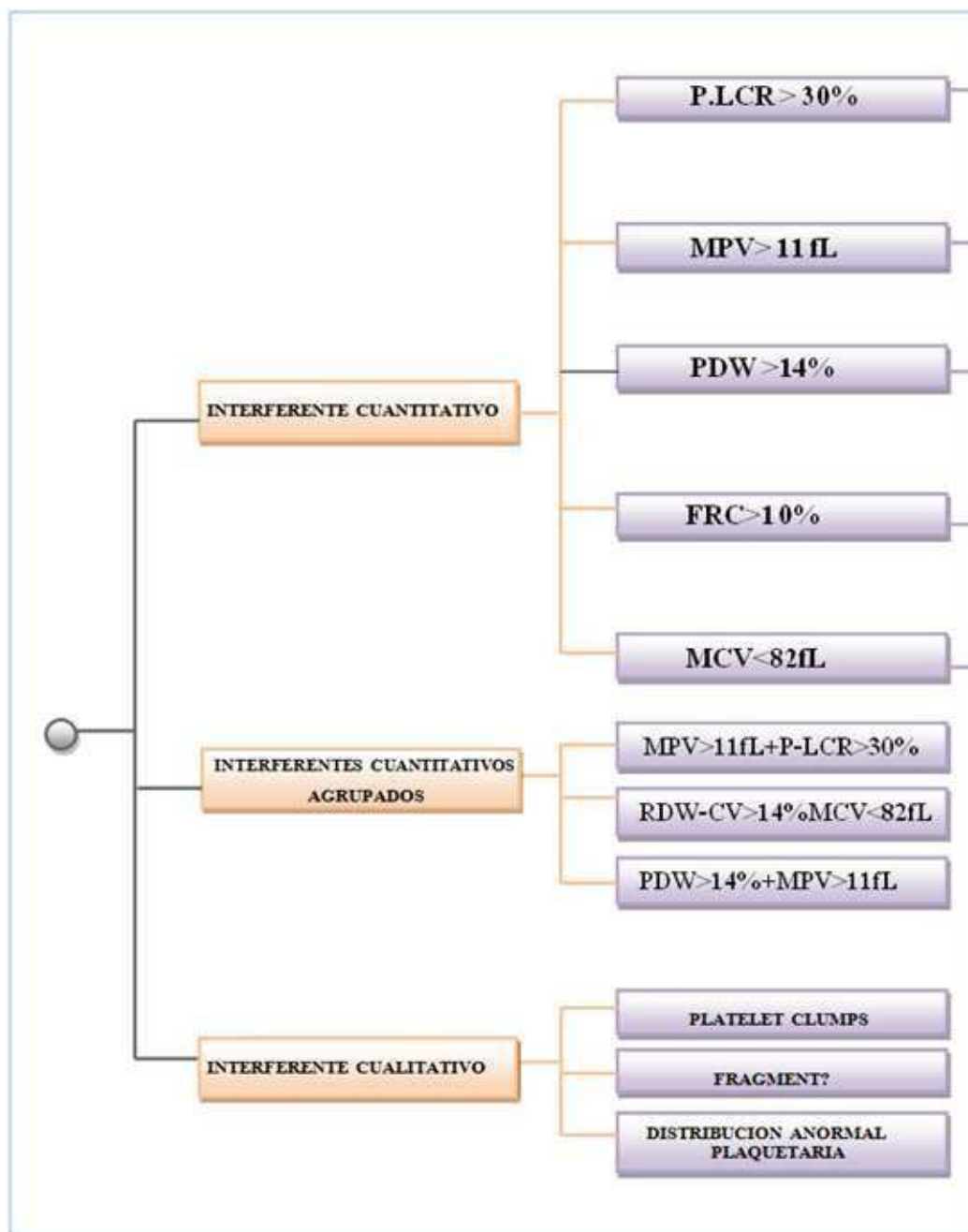
- Recuento menor o igual a $70 \times 10^9/L$
- Recuento mayor a $70 \times 10^9/L$ y menor a $150 \times 10^9/L$
- Recuento mayor o igual a $150 \times 10^9/L$ y menor o igual a $450 \times 10^9/L$
- Recuento mayor a $450 \times 10^9/L$



[†] Esta separación incluye solo al grupo patológico, el grupo normal está sólo en el grupo c. Esta estratificación se realizó según estudios anteriores realizados por Hong K.H. y col (14) y Guevara & Peralta (35) en el que se establecieron los mismos intervalos: intervalo trombocitopénico severo (muy bajo: $<50 \times 10^9/L$), trombocitopénico (bajo: entre $50 \times 10^9/L$ - $50 \times 10^9/L$), normal (entre $150 \times 10^9/L$ - $450 \times 10^9/L$) y trombocitosis (alto: $>450 \times 10^9/L$). Sin embargo en este estudio se hizo la variación de $50 \times 10^9/L$ por el valor de $70 \times 10^9/L$, debido a que el SYSMEX 2100 XE tiene este valor como corte para el funcionamiento del algoritmo de conmutación (ver anexo 11).

C. Separación por presencia de interferente^{††}:

Esta separación incluye sólo al grupo patológico, en el grupo normal los interferentes están ausentes o disminuidos y no causan influencia en el recuento. Los criterios que se tomaron para considerar los valores establecidos (ver imagen de abajo) de FRC%, MPV, MCV, RDW-CV es que deben estar fuera de los valores de referencia y, los parámetros P-LCR y PDW evaluados deben tener valores mayores a la media de los rangos de referencia.



Los datos debidamente filtrados fueron separados según el interferente que presentaban:

N*:interferente cuantitativo presente en la muestra analizada

M*:cantidad subtotal de muestras con un interferentes cuantitativos

N*	<50	50-150	151-450	>450	M*
P-LCR>30%					
MPV>11 fL					
PDW>14 %					
MCV<82 fL					
FRC%>10 %					

N**:interferentes cuantitativos agrupados presentes en la muestra analizada

M**:cantidad subtotal de muestras con dos interferentes cuantitativos

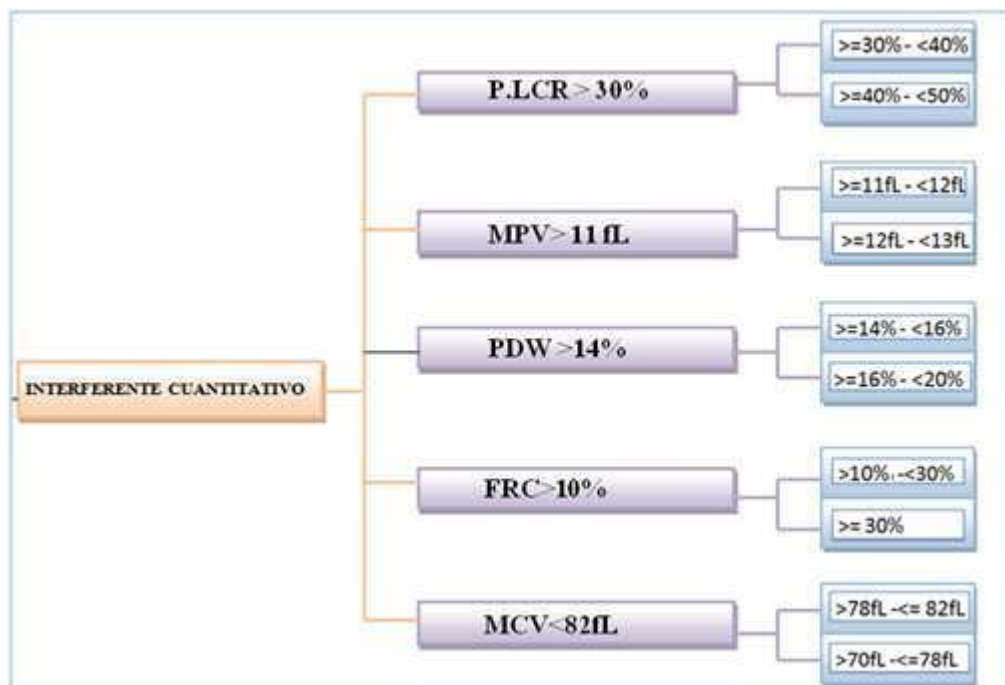
N**	<50	50-150	151-450	>450	M**
MPV>11 fL + P-LCR>30 %					
RDW-CV>14% + MCV<82fL					
PDW>14% + MPV>11fL					

N:interferentes cualitativo presentes en la muestra analizada

M:cantidad subtotal de muestras con dos interferentes cuantitativos

N	<50	50-150	151-450	>450	M
Platelet clump					
Fragment?					
Distribución anormal plaquetaria					

D. Separación por cantidad de interferente cuantitativo en particular^{†††}:



Los datos de cantidad de interferente cuantitativo se clasificaron en 2 intervalos para su posterior análisis. Los intervalos son los siguientes:

INTERFERENTE	INTERVALOS
PLCR: porcentaje de plaquetas gigantes	>=30% - <40%
	>=40% - <50%
MPV: volumen plaquetario medio	>=11fL - <12fL
	>=12fL - <13fL
PDW: ancho de distribución plaquetaria	>=14% - <16%
	>=16% - <20%
MCV: volumen corpuscular medio	>78fL - <= 82fL
	>70fL - <=78fL
FRC%: porcentaje de fragmentos de hematíes	>10% - <30%
	>= 30%

^{†††} Se evaluará e la totalidad de recuento plaquetario y en el intervalo 70-150x10⁹ plaquetas/L

ANEXO 5:

MUESTRAS DE SANGRE

PATOLÓGICAS: $n_p = 1305$

NORMALES: $n_n = 232$

Los recuentos plaquetarios obtenidos se agruparon según intervalos de plaquetas

Se realizó el recuento de plaquetas, mediante las 2 tecnologías de SYSMEX 2100 XE:

Recuento por impedancia: PLTI
Recuento óptico: PLTO

Obteniéndose 2 resultados para la misma muestra

Para cada uno de las muestras se determinó:

Error absoluto

Para el grupo normal
(e)=PLTO - PLTI

Y FINALMENTE SE DETERMINÓ A PARTIR DE LOS (e) OBTENIDOS:

MEDIA ARITMÉTICA DEL e: \bar{X}_e

DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL e: DS_e

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE e: CV_e

En este intervalo se agruparon según presencia de interferentes en particular en la muestra

INTERFERENTE CUANTITATIVO

P-LCR > 30%

MPV > 11 fL

PDW > 14%

FRC > 10%

MCV < 82 fL

INTERFERENTES CUANTITATIVOS AGRUPADOS

MPV > 11 fL + P-LCR > 30%

RDW-CV > 14% + MCV < 82 fL

PDW > 14% + MPV > 11 fL

INTERFERENTE CUALITATIVO

PLATELET CLUMPS

FRAGMENT?

Para cada uno de las muestras se determinó:

Error absoluto

para cada subgrupo patológicos:
(e)=PLTO - PLTI

ANEXO 6: OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Técnica o instrumento de medición
Metodología aplicada para el recuento de plaquetas	Procedimientos que se realizan para obtener el recuento de plaquetas por unidad de volumen, en una muestra de sangre con EDTA, dependiendo del principio o fundamento aplicado.	Resultados de cada metodología aplicaca: Recuento automatizado: <i>Impedancia (Sysmex 2100 XE full)</i> Recuento automatizado: <i>Citometría de fluorescencia(optical light scatter/Fluorescence) (Sysmex 2100 XE full)</i>	Tipo de metodología	Cuantitativo	Continua	Número de plaquetas obtenidas por cada tipo de metodología	Recuento automatizado: <i>Impedancia</i> Recuento automatizado: <i>Citometría de fluorescencia(optical light scatter/Fluorescence)</i>
Interferentes en el recuento plaquetario	Presencia de artefactos que asemejen a plaquetas y que pueden ser considerados en el recuento, produciendo una sobrestimación o subestimación del número real de plaquetas.	Resultados tanto cuantitativos y cualitativos de presencia de interferentes en cada muestra evaluada para el recuento de plaquetas	Tipos de interferentes directos	Cuantitativo	Continua	Fragmentos de hematies	Número de fragmentos obtenidos en el Sysmex 2100XE full
				Cualitativos	Nominal	Distribución anormal plaquetaria	Evaluación del histograma de plaquetas
						Agregados plaquetarios	Alarmas del Sysmex 2100XE full
			Tipos de interferentes indirectos	Cuantitativos	Continua	Fragments?	
						VCM: Volumen Corpuscular Medio	<i>Analizador hematológico</i>
						VPIM: Volumen plaquetario medio	<i>automatizado</i>
						P-LCR: porcentaje de células grandes de plaquetas	<i>SYSMEX 2100 XE FULL</i>
						PDW: Ancho de distribución de plaquetas	

Anexo 7:

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico n°1

Constantes de exactitud del método óptico en comparación al método de impedancia en muestras hemato-oncológicas (con interferentes) y normales.

Gráfico n°2

Coeficiente de correlación evaluado en el intervalo de $150-450 \times 10^9/L$ del método de citometría de fluorescencia en comparación del método de impedancia en muestras patológicas (con interferentes) y normales.

Gráfico n°3

Coeficiente de correlación evaluado en el intervalo de $70-150 \times 10^9/L$ del método de citometría de fluorescencia en comparación del método de impedancia en muestras patológicas (con interferentes) y normales.

Gráfico n°4

El r de Pearson según la cantidad de interferentes en el intervalo de $70-150 \times 10^9/L$

Gráfico n°5

Regresión lineal del método de citometría de fluorescencia (PLT-O) en comparación al método de la impedancia (PLT-I) en el intervalo de $70-150 \times 10^9/L$ en presencia de $FRC > 9.9\%$

Gráfico n°6

Regresión lineal del método de citometría de fluorescencia (PLT-O) en comparación al método de la impedancia (PLT-I) en el intervalo de $150-450 \times 10^9/L$ en presencia de $FRC > 9.9\%$

Gráfico n°7

Regresión lineal del método de citometría de fluorescencia (PLT-O) en comparación al método de la impedancia (PLT-I) en el intervalo de $150-450 \times 10^9/L$ en muestras normales

Gráfico n°8

Gráficos del Test de Bland-Altman: “difference plot” e histograma de diferencias para las metodologías de impedancia y citometría de fluorescencia en muestras normales.

Gráfico n°9

Gráficos del Test de Bland-Altman: “difference plot” para las metodologías de impedancia y citometría de fluorescencia en muestras con interferentes relacionados a macroplaquetas y microcitos.

Gráfico n°10

Gráfico del Test de Bland-Altman: “difference plot” para las metodologías de impedancia y citometría de fluorescencia en muestras con $FRC\% > 10\%$

Gráfico n°11

Gráfico del Test de Bland-Altman: “difference plot” para las metodologías de impedancia y citometría de fluorescencia en muestras con agregados plaquetarios

Gráfico n°12

Gráfico de frecuencias de interferentes presentes en frotis de sangre periférica de muestras de pacientes hemato-oncológicos, $n=133$

Gráfico n°13

Regresión lineal del método de recuento manual de Dameshek (PLT-D) en comparación al método de impedancia (PLT-I) en muestras trombocitopénicas de pacientes hemato-oncológicos

Gráfico n°14

Regresión lineal del método de recuento manual de Dameshek (PLT-D) en comparación al método óptico (PLT-O) en muestras trombocitopénicas de pacientes hemato-oncológicos

Gráfico n°15

Comparación del porcentaje de casos con error por exceso y defecto para el método de impedancia con respecto al método óptico en muestras con microcitos ($MCV < 82$ fL)

Gráfico n°16

Comparación del porcentaje de casos con error por exceso y defecto para el método de impedancia con respecto al método óptico en muestras con fragmentos de hematíes (FRC%>10%)

Anexo 8:**ENTIDADES HEMATO ONCOLÓGICAS**

ENTIDADES HEMATO ONCOLÓGICAS	SUBTOTALES
Leucemia/linfoma linfoblástico de células B	562
LMA (leucemia mieloide aguda)	146
Linfoma de células grandes B difuso	142
Leucemia/linfoma linfoblástico de células T	126
Linfoma de Burkitt-linfoma de Hodgkin	65
LMC (leucemia mieloide crónica)	54
Linfoma no Hodgkin	52
neoplasia de células redondas	38
Linfoma anaplásico de células AKL negativas y positivos	24
Síndrome mielodisplásico , RAEB II	20
LLC (leucemia linfoide crónica)	18
Neoplasia maligna residual	15
linfoma folicular	12
LMMC	8
Neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides	7
linfoma maligno	7
Linfoma T periférico	6
ATLL (linfoma de células T del adulto)	3
TOTAL	1305

Anexo 9:

DEFINICION DE TERMINOS

ANTICUERPOS MONOCLONALES: Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una sola célula madre.

ANTIGENO: Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria, son usualmente proteínas o polisacáridos.

CITOMETRIA DE FLUJO: Es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Para su análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido.

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R^2): En un modelo de regresión lineal el coeficiente de determinación se interpreta como el porcentaje de variación de la variable dependiente.

COEFICIENTE DE CORELACIÓN DE PEARSON (r): El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas.

COEFICIENTE DE VARIACION: Es una medida de dispersión útil para comparar dispersiones a escalas distintas pues es una medida invariante ante cambios de escala. Su fórmula expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad que la desviación típica o estándar. Por otro lado presenta problemas ya que a diferencia de la desviación típica este coeficiente es variable ante cambios de origen. Por ello es importante que todos los valores sean positivos y su media dé, por tanto, un valor positivo. A mayor valor de C.V. mayor heterogeneidad de los valores de la variable; y a menor C.V., mayor homogeneidad en los valores de la variable.

DESVIACIÓN ESTÁNDAR: La desviación estándar o desviación típica (σ) es una medida de centralización o dispersión para variables de razón (ratio o cociente) y de intervalo. Se define como la raíz cuadrada de la varianza. Junto con este valor, la desviación típica es una medida (cuadrática) que informa de la media de distancias que tienen los datos respecto de su media aritmética, expresada en las mismas unidades que la variable.

DISPERSION FRONTAL: La luz dispersa frontal indica el volumen celular.

DISPERSION LATERAL: La luz dispersa lateral indica el contenido interno celular, como núcleos y gránulos

DISPERSION LATERAL FLUORESCENTE: Indica la cantidad de ADN y ARN presente.

DISPERSOGRAMA: Gráfico que representa la distribución de dos variables en una población de muestra. Una variable se representa gráficamente en el eje vertical; la otra en el horizontal. Un dispersograma demuestra el grado o tendencia de presentación de las variables en relación mutua.

EDTA: Son las siglas de ácido etilen diamino tetra acético, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica.

ENFOQUE HIDRODINAMICO: Es un principio en el cual un sistema fluídico hace que las partículas a contar (células), permanezcan debidamente alineadas cerca de la apertura o zona de detección, evitando así errores de coincidencia.

ERROR ABSOLUTO: El error absoluto de una medida es la diferencia entre el valor real de una magnitud y el valor que se ha medido.

ERROR RELATIVO: Error o incertidumbre en una medición, expresado como la relación del error absoluto y el valor verdadero absoluto.

EXACTITUD: Es la cercanía del valor experimental obtenido, con el valor exacto de dicha medida. El valor exacto de una magnitud física es un concepto utópico, ya que es imposible conocerlo sin incertidumbre alguna.

FENOMENO DE COINCIDENCIA: Se da cuando una pareja de partículas (células) atraviezan en simultaneo la zona sensible de apertura. Esta pareja se expresa como un único pulso eléctrico y es contabilizado como una sola partícula.

FLAG: Son alarmas emitidas en casos en que el equipo no tiene la capacidad de discriminar a determinadas células, o presencia de algún elemento interferente.

FLUORESCENCIA: Es la propiedad que tienen algunas sustancias de absorber energía y luego emitir parte de esa energía en forma de luz.

FLUOROFORO: Las sustancias que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.

HEMOCITOMETRO: También llamada cámara de recuento celular Neubauer, este aparato es utilizado para contar células existentes en un volumen de sangre o de otro líquido

HEMOLISIS INTRAVASCULAR: Sucede cuando los eritrocitos sufren lesiones mecánicas o fijación del complemento o bien agresión por tóxicos exógenos principalmente dentro de los vasos sanguíneos.

HISTOGRAMA: Es una representación gráfica de una variable en forma de barras, donde la superficie de cada barra es proporcional a la frecuencia de los valores representados. En el eje vertical se representan las frecuencias, y en el eje horizontal los valores de las variables, normalmente señalando las marcas de clase, es decir, la mitad del intervalo en el que están agrupados los datos.

ICSH: Siglas de International Council Standardization in Haematology

IMPEDANCIA: La impedancia es una magnitud que establece la relación (cociente) entre la tensión y la intensidad de corriente.

INTERCEPTO: Es cuando dos rectas se unen en un punto determinado dentro de un plano cartesiano.

ISLH: Siglas de International Society for Laboratory Hematology

LASER SEMICONDUCTOR: Un láser (de la sigla inglesa light amplification by stimulated emission of radiation, amplificación de luz por emisión estimulada de radiación) es un dispositivo que utiliza un efecto de la mecánica cuántica, la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente de un medio adecuado y con el tamaño, la forma y la pureza controlados.

PENDIENTE: Es el ángulo formado por una recta con su proyección sobre el horizonte.

POLIMETINA: Es un colorante básico que se une a los componente ácidos de la sangre; el ADN en el núcleo celular y el ARN encontrado en el citoplasma de la célula. La cantidad de colorante que es unido por cada tipo de célula depende del contenido de ácido nucleico de la célula. Los leucocitos unirán más colorante, por la gran cantidad de ADN contenido en el núcleo, mientras que las plaquetas unirán mucho menos colorante debido

a la pequeña cantidad de ARN presente y a su pequeño tamaño físico. Los hematíes unirán trazas de colorante y los reticulocitos unirán cantidades variables de colorante, dependiendo de la cantidad de ARN que contengan.

PULSO ELECTRICO: Cambio de resistencia eléctrica (cambio en la diferencia de potencial) que es proporcional al volumen de electrolito desplazado (37)

REFRACCIÓN: es el cambio de dirección que experimenta una onda al pasar de un medio material a otro.

REGRESION LINEAL: Método estadístico que tiene como finalidad encontrar una recta que ajuste la nube de puntos del diagrama producido por dos variables, y que pueda ser utilizada para predecir los valores de Y a partir de los de X. La ecuación general de la recta de regresión está basada en el método de los mínimos cuadrados, y se representa de la forma: $Y = a + bX$.

TEST DE BLAND-ALTMAN: Este método consiste en construir una gráfica donde en el eje horizontal se representa la diferencia absoluta entre dos mediciones para cada sujeto y en el eje vertical la proporción de casos en los que las discrepancias igualan al menos cada una de las diferencias observadas. La gráfica se construye igual que en un análisis de supervivencia, donde ningún caso es censurado, y el papel de la variable “tiempo” lo juega aquí la diferencia absoluta entre las mediciones.

TEST DEL CHI-CUADRADO: Esta prueba permite determinar si dos variables cualitativas están o no asociadas. Si al final del estudio concluimos que las variables no están relacionadas podremos decir con un determinado nivel de confianza, previamente fijado, que ambas son independientes. Para su cómputo es necesario calcular las frecuencias esperadas (aquellas que deberían haberse observado si la hipótesis de independencia fuese cierta), y compararlas con las frecuencias observadas en la realidad.

Anexo 10:

Muestras con recuentos menores a $70 \times 10^9/L$ y con presencia del Flag: "plt abn distribution"

Sample No	Date of analyze	S.A.	PLT-I	PLT-O	Entidad oncológica
309008622	09/03/2011	2	1	2	Linfoma anaplasico de celulas grandes
316026622	16/03/2011	3	3	3	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
327000122	27/03/2011	3	3	3	LMA
317003622	17/03/2011	4	3	4	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307008522	07/03/2011	4	1	4	Linfoma anaplasico de celulas grandes
321009522	21/03/2011	4	4	4	LMA
318000922	18/03/2011	5	3	5	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307007622	07/03/2011	5	5	5	Linfoma de Burkitt
505002622	05/05/2011	5	2	5	LMA
305001322	05/03/2011	5	4	5	LMA
317019522	17/03/2011	5	4	5	LMC crisis blastica
319000822	19/03/2011	5	5	5	LMC crisis blastica
117011022	17/01/2011	6	6	14	leucemia/linfoma de celula T precursoras
323004722	23/03/2011	6	2	6	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
321005922	21/03/2011	6	3	6	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
318001922	18/03/2011	6	5	6	LMMC
319001222	19/03/2011	7	3	7	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
321011822	21/03/2011	7	3	7	LMC crisis blastica
502007522	02/05/2011	8	7	8	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
310001922	10/03/2011	10	8	10	leucemia/linfoma de celulas T precursoras
505012222	05/05/2011	10	6	10	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
323002022	23/03/2011	10	8	10	neoplasia maligna de celulas redondas
307004122	07/03/2011	11	10	11	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
504006722	04/05/2011	11	11	11	LMA
323006422	23/03/2011	11	13	11	LMA
309013822	09/03/2011	12	7	12	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
420045122	20/04/2011	12	12	12	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
308004322	08/03/2011	12	9	12	Linfoma de Burkitt
321009022	21/03/2011	12	10	12	LMA
425010322	25/04/2011	13	17	13	leucemia promielocitica aguda
307007422	07/03/2011	13	11	13	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
323004922	23/03/2011	13	11	13	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
317006322	17/03/2011	13	14	13	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
322029822	22/03/2011	14	11	14	leucemia linfoblástica
307008622	07/03/2011	14	11	14	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
505002322	05/05/2011	15	12	15	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
324004222	24/03/2011	15	12	15	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
315031122	15/03/2011	15	12	15	LMA
321003422	21/03/2011	16	11	16	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
316026522	16/03/2011	16	13	16	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B

Sample No	Date of analyze	S.A.	PLT-I	PLT-O	Entidad oncológica
317004122	17/03/2011	16	15	16	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
314006922	14/03/2011	17	13	17	leucemia/linfoma de celulas T precursoras
506003122	06/05/2011	17	13	17	leucemia/linfoma de celulas T precursoras
427008922	27/04/2011	17	17	17	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
505014322	05/05/2011	17	12	17	LMA
321003122	21/03/2011	17	13	17	LMA
505002522	05/05/2011	18	10	18	leucemia/linfoma de celulas T precursoras
318003922	18/03/2011	18	11	18	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
321004222	21/03/2011	18	17	18	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
321011022	21/03/2011	18	14	18	Linfoma de células grandes B
507003922	07/05/2011	19	15	19	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
310002522	10/03/2011	19	18	19	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307004022	07/03/2011	19	16	19	Linfoma de células grandes B
314008722	14/03/2011	21	20	21	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
318002422	18/03/2011	21	21	21	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307002422	07/03/2011	21	27	21	LMA
324010922	24/03/2011	24	27	24	LMA
317003922	17/03/2011	26	25	26	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
323006722	23/03/2011	26	29	26	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
309008522	09/03/2011	28	25	28	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307008922	07/03/2011	28	30	28	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
309008522	09/03/2011	29	25	29	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
317006522	17/03/2011	30	25	30	Linfoma de células grandes B
316006822	16/03/2011	32	32	32	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
318001822	18/03/2011	32	31	32	LMA
321003822	21/03/2011	33	38	33	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
304028322	04/03/2011	34	33	34	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
504012222	04/05/2011	36	35	36	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
317003722	17/03/2011	38	37	38	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
307006822	07/03/2011	39	40	39	LNH
502004922	02/05/2011	40	37	40	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
324005322	24/03/2011	46	40	46	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
309015422	09/03/2011	47	53	47	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
319001522	19/03/2011	47	46	47	neoplasia maligna de celulas redondas
506006222	06/05/2011	54	49	54	LNH
307002222	07/03/2011	55	48	55	Linfoma de células grandes B
505003822	05/05/2011	55	41	55	LNH
324004422	24/03/2011	58	52	58	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
321005322	21/03/2011	58	59	58	Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
316001522	16/03/2011	62	66	62	LMA
316022922	16/03/2011	67	64	67	linfoma maligno

S.A.: Recuento reportado por el algoritmo de conmutación (Switching Algorithm)

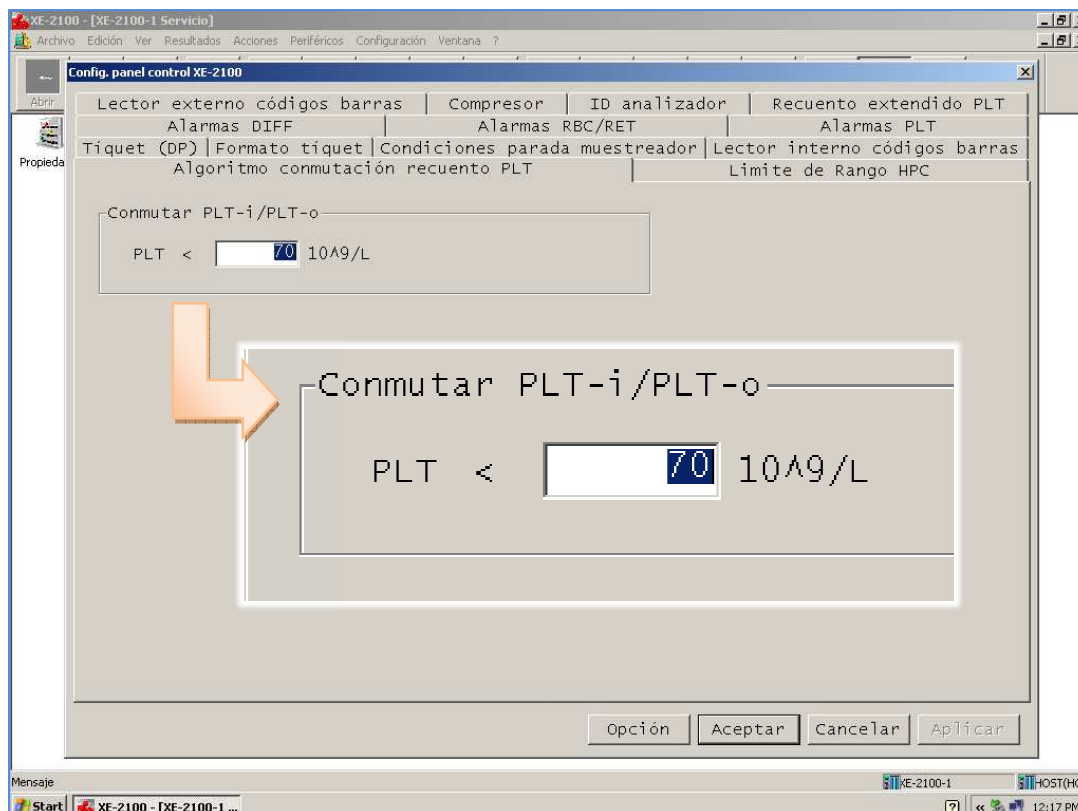
Anexo 11:

Bibliografía: uso del valor de $70 \times 10^9/L$

Se publicó en el volumen 26 de la revista *Clinical & Laboratory Haematology* el año 2004 una carta al editor: **“The most accurate platelet count on the Sysmex XE-2100. Optical or impedance?”**, menciona lo siguiente:

*“There is a switching algorithm used to report the most ‘correct’ platelet count, either the optical or impedance. In samples with microcytic or fragmented red cells or giant platelets the platelet distribution curve is affected and the optical count will be reported. In the presence of white cell fragments, which are included in the optical platelet count, a platelet abnormal scatter gram flag is generated and the switching algorithm causes the impedance count to be reported”... “Overriding the **switching algorithm** and setting the analyser to report the optical count at counts below a preset level, **typically $50 \times 10^9/L$** has become a widespread practice”*

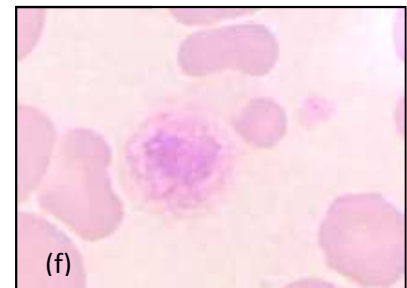
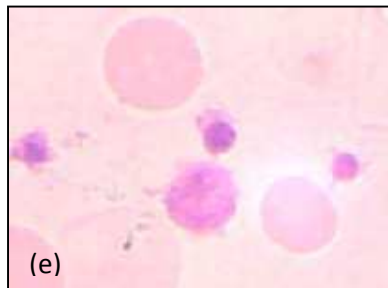
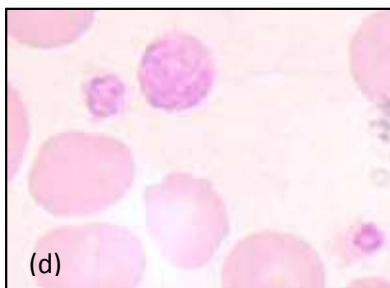
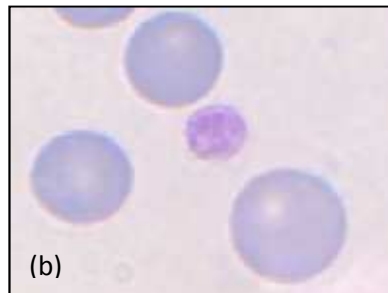
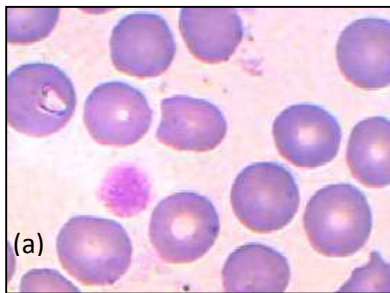
El analizador hematológico SYSMEX 2100 XE utilizado en el INEN, utiliza el nivel de $70 \times 10^9/L$ para el funcionamiento del algoritmo de conmutación. Se muestra en la siguiente imagen:



Anexo 12:

IMÁGENES

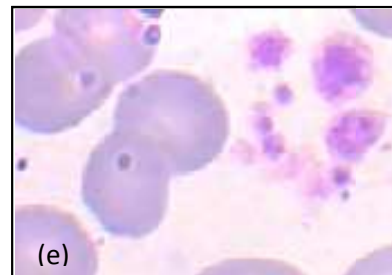
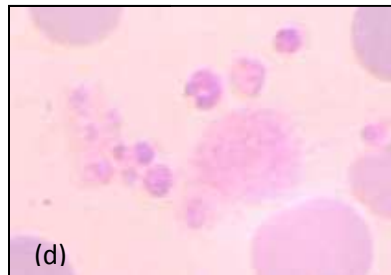
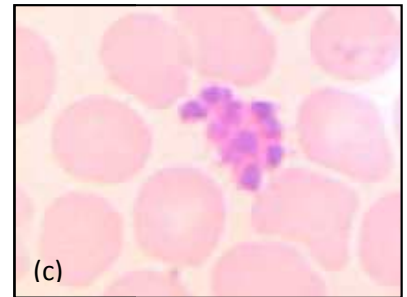
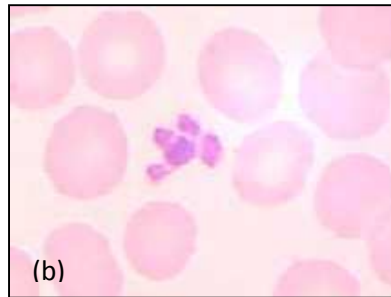
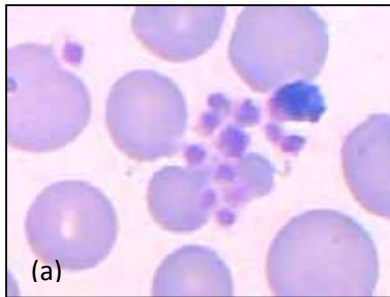
MACROPLAQUETAS:



...tas de diferente tamaño.
...férica, coloración Wright,

IMÁGENES

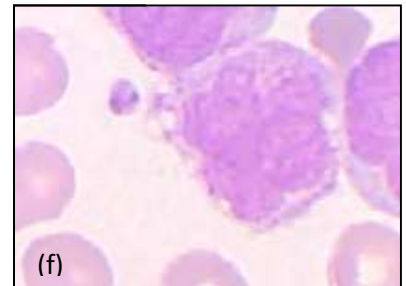
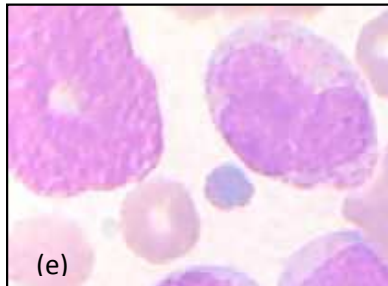
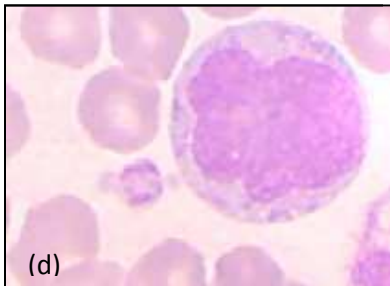
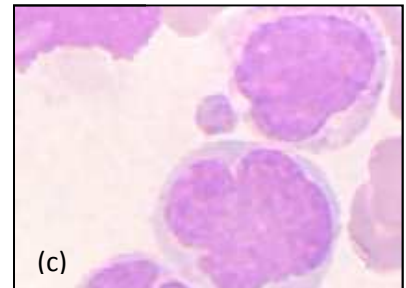
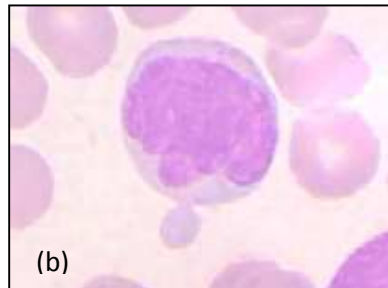
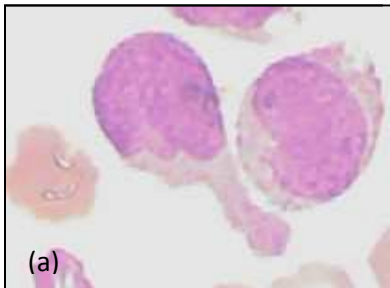
AGREGADOS PLAQUETARIOS:



(d) plaquetas agregadas y
eritrocitos de sangre periférica,

IMÁGENES

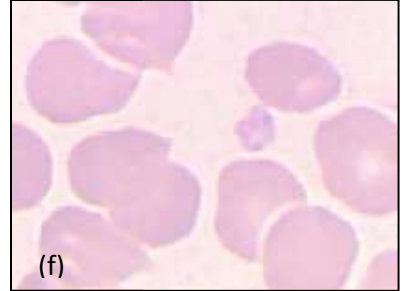
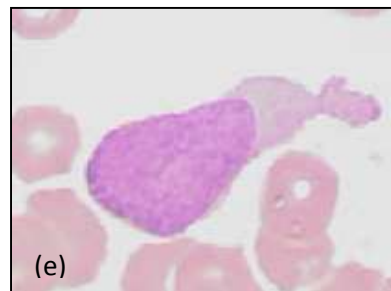
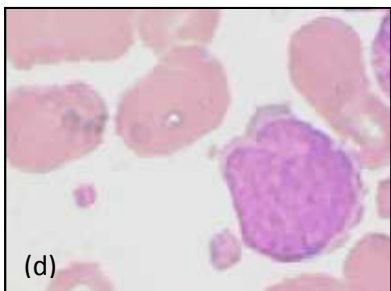
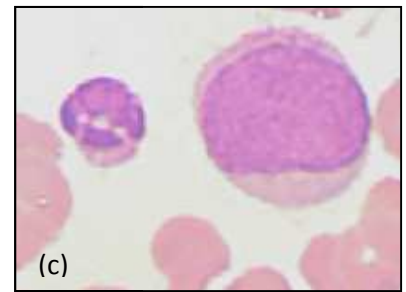
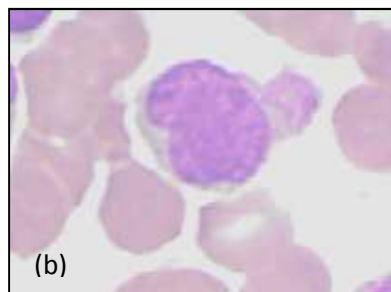
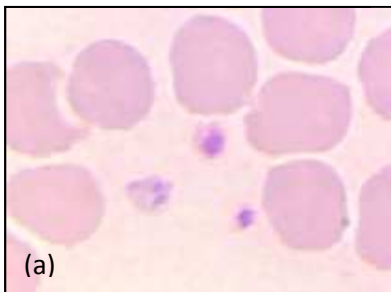
FRAGMENTOS CELULARES:



euocitario citoplasmático
rio (c) un fragmento entre
ción Wright, amplificación

IMÁGENES

INTERFERENTES:



is (b, e) desprendimiento de
Frotis de sangre periférica,